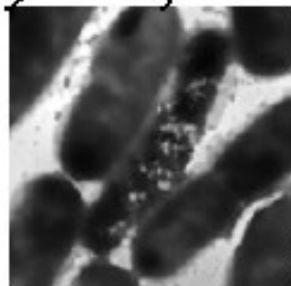
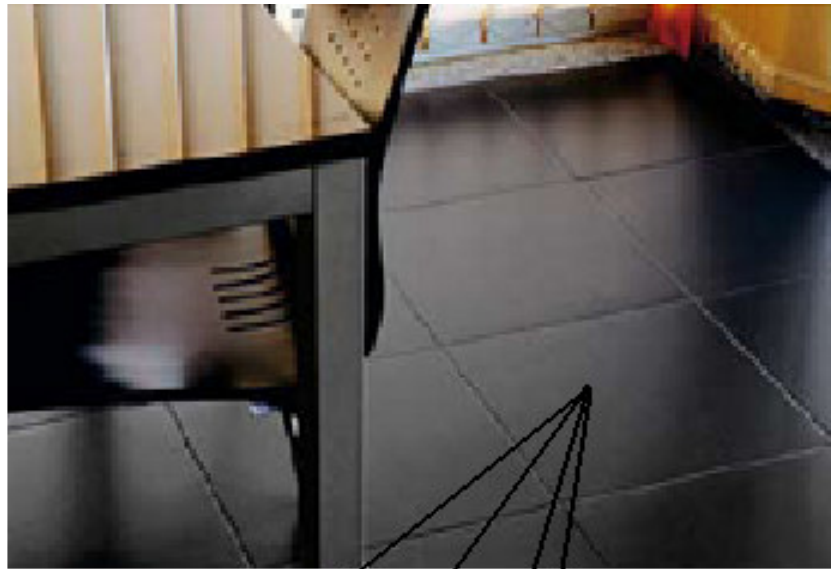




**Luciana Cristina da
Silva Grave**

**Porcelanato extrudido com acção antimicrobiana,
antimancha e resistente quimicamente**





**Luciana Cristina da
Silva Grave**

**Porcelanato extrudido com acção antimicrobiana,
antimancha e resistente quimicamente**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Cerâmica e do Vidro, realizada sob a orientação científica da Dr.^a Maria Paula Seabra, Investigadora do Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro da Universidade de Aveiro e do Dr. João António Labrincha Batista, Professor Associado com Agregação do Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Dr.^a Maria Helena Figueira Vaz Fernandes

Professora associada da Universidade de Aveiro

Eng.^o Augusto Vaz Serra e Sousa

Especialista e administrador executivo do Centro Tecnológico da Cerâmica e do Vidro

Dr.^a Maria Paula da Silva Seabra

Investigadora auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. João António Labrincha Batista

Professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para tornar possível este trabalho.

Para todos vós, que a vida vos sorria sempre!

palavras-chave

Nitrato de prata, acção antimicrobiana, vidrado, porcelanato extrudido, pigmentos cerâmicos.

resumo

O presente trabalho tem por objectivo desenvolver um produto em porcelanato extrudido com acção antimicrobiana (isto é, que sirva de obstáculo ao crescimento de bactérias, durante um longo período de tempo), antimancha (isto é, que seja mais de limpar) e resistente quimicamente.

A acção antimicrobiana é comprovada através da taxa de redução das bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativa *Escherichia coli*.

A acção antimancha e a resistência química são confirmadas pelos resultados dos testes de resistência às manchas e de resistência química, respectivamente.

Conclui-se que é possível obter um produto antimicrobiano com uma eficácia acima dos 77% para a bactéria *S. aureus* e dos 81% para a bactéria *E. coli*. Este material é obtido a partir de uma pasta de porcelanato extrudido com 2,5% de pigmento cerâmico preto, contendo crómio e ferro na sua composição, seguido de uma aplicação, à pistola, de uma pequena quantidade de vidrado K e de um tratamento químico (solução com 98% NaNO₃ e 2% AgNO₃) e térmico (2 horas a 430°C).

O efeito antimicrobiano conseguido, só funciona quando as bactérias estão em contacto directo com as peças cerâmicas.

O produto desenvolvido possui características antimancha, pertencendo à classe 5 de acordo com a norma ISO 10545-14 e é resistente quimicamente, sendo classificado pela norma ISO 10545-13 como UA, ULA e UHA para todos os agentes químicos testados, excepto para a solução de ácido clorídrico, 18%(v/v), que promove um ligeiro ataque químico na sua superfície (UHB).

keywords

Silver nitrate, antimicrobial action, glazed, extruded porcelain tiles, ceramic pigments.

abstract

This work aims to develop extruded porcelain tiles with antimicrobial action (to act as a barrier to the bacteria's growth during a long period of time), antistains (more easy to clean), and chemical resistant.

The antimicrobial action can be proven through the reduction rate of Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and Gram-negative *Escherichia coli*. Antistains action and chemical resistance can be demonstrated through the tests of resistance to stains and chemical resistance, respectively.

It is possible to develop an antimicrobial product, with an efficacy above 77% for bacteria *S. aureus* and 81% for bacteria *E. coli*. This material is obtained from a paste of extruded porcelain with 2,5% of black ceramic pigment, that has chromium and iron in its composition, followed by a jet spray application of a small quantity of glaze and a chemical (solution of 98% NaNO_3 and 2% AgNO_3) and thermal (2 hours at 430°C) treatments.

The antimicrobial effect achieved, only work when the bacteria are directly in contact with the developed product.

This product has antistains characteristics, belonging to class 5 according ISO 10545-14 standard. It is chemically resistant being classified, according to ISO 10545-13 standard, as UA, ULA and UHA for all chemical agents, except for chloridric acid, 18%(v/v), for which suffer a small surface chemical attack (UHB).

Índice

Índice	i
Lista de figura	v
Lista de símbolos	ix
Lista de tabelas	xi
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. A actividade antimicrobiana da prata	2
1.3. A bactéria <i>Escherichia coli</i>	3
1.3.1. Generalidades	3
1.3.2. A interacção com o ião prata	4
1.4. A bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.4.1. Generalidades	6
1.4.2. A interacção com o ião prata	7
1.5. Principais diferenças e semelhanças entre <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	8
1.6. A influência do ferro e do crómio na inibição do crescimento da <i>E. coli</i>	10

1.7. Vidrados -----	13
1.7.1. Função -----	13
1.7.2. Preparação e aplicação -----	13
1.7.3. Vitrificação -----	14
1.8. Troca iónica -----	15
1.9. Porcelanato extrudido -----	19
1.9.1. Definição -----	19
1.9.2. Características técnicas -----	19
1.9.3. Formatos e tipologia de produtos -----	20
2. Metodologia -----	25
2.1. Caracterização da pasta de porcelanato extrudido -----	25
2.2. Caracterização do vidro K e do produto -----	25
2.3. Peças em porcelanato extrudido com aplicação dos vidrados -----	26
2.4. Ensaio complementares -----	27
2.5. Avaliação da actividade antimicrobiana -----	28
2.5.1. Teste da difusão em agar -----	28

2.5.2. Teste da redução (R) -----	28
3. Análise e discussão dos resultados -----	30
3.1. Caracterização da pasta de porcelanato extrudido -----	30
3.2. Caracterização do vidrado K e do produto -----	31
3.3. Comportamento antimicrobiano das peças em porcelanato extrudido -----	37
3.3.1. Influência do vidrado K -----	37
3.3.2. Influência do tratamento químico e térmico -----	38
3.3.3. Influência da adição do pigmento de Ferro e Crómio -----	39
3.3.4. Redução da actividade da bactéria <i>S. aureus</i> das duas melhores composições -----	42
3.3.5. Difusão em ágar para a <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> -----	42
3.3.6. Comportamento do porcelanato extrudido com características antimicrobianas -----	44
4. Conclusões e sugestões para trabalhos futuros -----	48
Anexo I - Procedimento para o teste da difusão em ágar -----	50
Anexo II – Procedimento para o teste da redução -----	53
Anexo III - Resultados dos ensaio antimicrobianos -----	56

Bibliografia	57
--------------------	----

Lista de figuras

Figura 1 – Número médio de bactérias, em unidades formadoras de colónias (UFC) por metro cúbico (m^3), existente em diversos ambientes [2]. ----- 1

Figura 2 – Morfologia da bactéria *E. coli*, observada por TEM: (a) Bactéria não tratada; (b, c e d) Bactéria tratada com uma solução de iões de prata (0,2 ppm), em que é visível em (b e d) o seu estado de degradação e (c) os precipitados no interior da mesma [14].----- 5

Figura 3 – Estrutura interna da *E. coli* observada por TEM: (a e b) Bactéria não tratada; (c e d) Bactéria tratada com uma solução de 0,2 ppm de iões de prata. As setas em (b) indicam a membrana externa (seta preta) e a membrana citoplasmática do exterior da célula (seta branca). As setas vermelhas em (c) indicam a separação da membrana celular a partir da parede celular [14]. ----- 6

Figura 4 – Estrutura da *S. aureus* observada por TEM: (a e b) Bactéria não tratada; (c e d) Bactéria tratada com solução de 0,2 ppm de iões de prata. As setas pretas e brancas em (b) indicam a camada peptidoglicana e a membrana citoplasmática, respectivamente. As setas vermelhas em (c e d) indicam a separação da membrana celular da parede da célula [14].- 7

Figura 5 – Estrutura externa da *S. aureus* observada por TEM: (a) Bactéria não tratada; (b a d) Bactéria tratada com solução de 0,2 ppm de iões de prata. As setas brancas em (c) apontam os precipitados encontrados nas células danificadas. As setas negras em (d) indicam a libertação do conteúdo celular [14]. ----- 8

Figura 6 – Representação esquemática das diferenças entre a estrutura fina da parede celular das bactérias Gram-positivas (b), como é o caso da bactéria *S. aureus* e da estrutura mais espessa das bactérias Gram-negativas (a), como é o caso da bactéria *E. coli* [5]. ----- 9

Figura 7 – Efeitos do Cr^{3+} e da interacção entre o crómio e as várias concentrações de Fe^{2+} e Fe^{3+} na taxa de crescimento da bactéria <i>E. coli</i> após 3,5 horas incubada a 37°C. Cada resultado representa três experiências independentes [22]. -----	12
Figura 8 – Distribuição dos elementos no vidro antes da troca iónica na direcção perpendicular à superfície [33]. -----	16
Figura 9 – Distribuição de elementos no vidro após a troca iónica na direcção perpendicular à superfície [33]. -----	16
Figura 10 – Perfil de concentração da prata no vidro em função do tempo de tratamento iónico [33]. -----	17
Figura 11 – Perfil de concentração da prata no vidro em função da temperatura do tratamento iónico [33]. -----	18
Figura 12 – Diversidade de formatos produzidos. -----	20
Figura 13 – Produto monocromático polido e natural. -----	21
Figura 14 – Gama de produtos com efeito “sal e pimenta”. -----	21
Figura 15 – Produto estruturado e destonalizado. -----	22
Figura 16 – Gama de produtos com microgranitos. -----	22
Figura 17 – Produto obtido pela decoração com vidrado e sais solúveis. -----	23
Figura 18 – Produto rústico estruturado e vidrado. -----	24
Figura 19 – Análise dilatométrica da pasta de porcelanato extrudido. -----	31

Figura 20 – Mecanismo de interacção entre um microporo e a sujidade [36]. -----	31
Figura 21 – Micrografia (MEV) das superfícies do ladrilho sem (a) e com (b) a aplicação do vidrado K. -----	32
Figura 22 – Difractograma de raios X do vidrado K. -----	33
Figura 23 – Curva dilatométrica do vidrado K. -----	34
Figura 24 - Resultados do teste de redução da <i>E. coli</i> às amostras de pasta natural com e sem o vidrado K. -----	37
Figura 25 - Resultados do teste de redução da <i>E. coli</i> às amostras de pasta natural com vidrado K com e sem o tratamento químico e térmico. -----	38
Figura 26 – Microestrutura (MEV) do pigmento preto e análise química por EDX dos grãos assinalados na micrografia. -----	39
Figura 27 – Resultados do teste de redução da <i>E. coli</i> às amostras de pasta natural e pasta cinza escura não vidradas. -----	40
Figura 28 - Resultados do teste de redução da <i>E. coli</i> às amostras de pasta cinza claro, cinza escuro e preto com e sem o tratamento químico e térmico. -----	41
Figura 29 - Resultados comparativos do teste de redução da <i>E. coli</i> e da <i>S. aureus</i> às amostras de pasta cinza escuro e preto com vidrado K e o tratamento térmico. -----	42
Figura 30 – Teste da difusão em agar para as bactérias <i>E. coli</i> (A) e para a <i>S. aureus</i> (B), para as diversas pastas com o vidrado K e o tratamento químico e térmico (KT - pasta natural, 1020KT - pasta cinza claro, 1025KT - pasta cinza escura e 1030 KT - pasta preta). -----	43

Figura 31 – Microestrutura (MEV) do ladrilho preto antimicrobiano e análise química por EDX numa área da micrografia. -----	47
Figura A1 – Colocação do meio de cultura nas caixas de <i>petri</i> . -----	50
Figura A2 – Amostras prontas para incubação durante 24 horas a 37°C. -----	51
Figura A3 – Transferência do TSB para os tubos de ensaio. -----	52
Figura A4 – Transferência de células para o tubo de ensaio. -----	53
Figura A5 – Promoção do crescimento das células no agitador. -----	53
Figura A6 – Pormenor dos vários tubos de ensaio com as diluições. -----	54
Figura A7 – Colocação da amostra a testar no erlenmeyer. -----	55
Figura A8 – Colocação dos erlenmeyers no agitador. -----	55
Figura A9 – Aspecto das placas de <i>petri</i> nas quais serão contadas as UFC. -----	55

Lista de símbolos

PNCI – Programa nacional de prevenção e controlo da infecção associada aos cuidados de saúde

UFC – Unidades de colónias de bactérias ou unidades formadoras de colónias

E. coli - *Escherichia coli*

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

Na⁺ - Ião de sódio

Ag⁺ - Ião de prata

Al³⁺ - Ião de alumínio

Ca²⁺ - Ião de cálcio

Mg²⁺ - Ião de magnésio

K⁺ - Ião de potássio

K – Designação do vidro

MEV – Microscopia electrónica de varrimento

R – Redução de bactérias no ensaio

Co – Número de UFC no teste com a amostra de controlo (vidro K)

C – Número de UFC com o material em teste

S – Taxa de sobrevivência

Cr – Crómio

Fe - Ferro

EN – Norma europeia

ISO – International standard organization

PR – Perda ao rubro ou perda ao fogo

Ra - Rugosidade média das amostras

Rz - Diferença entre as médias das irregularidades dos 5 pontos mais e dos 5 pontos menos salientes

Rmáx - Altura máxima das irregularidades

L – Agente químico de baixa concentração

H – Agente químico de elevada concentração

A – Produto não sofre ataque químico

B – Produto sofre ligeiro ataque químico

TSA – Tryptic Soy Agar

TSB - Tryptic Soy Broth

Lista de tabelas

Tabela 1 – Ensaio a realizar. -----	27
Tabela 2 – Composição química da pasta de porcelanato extrudido. -----	30
Tabela 3 – Valores de rugosidade das superfícies sem e com a aplicação do vidrado. ---	32
Tabela 4 – Composição química do vidrado K, determinada por FRX-----	33
Tabela 5 – Resistência às manchas medida de acordo com a norma ISO 10545-14 [37], dos ladrilhos sem e com vidrado K. -----	35
Tabela 6 - Resistência química medida de acordo com a norma ISO 10545-13 [38], dos ladrilhos com aplicação do vidrado K. -----	36
Tabela 7 – Características técnicas do produto com vidrado K. -----	36
Tabela 8 – Resultados da taxa de redução da bactéria <i>E. coli</i> . -----	41
Tabela 9 – Resultados dos ensaios de resistência às manchas de acordo com a norma ISO 10545-14 [37], dos ladrilhos com aplicação dos vidrados K e dos ladrilhos antimicrobianos (pastas cinza escuro e preta ambas com vidrado K e tratamento iónico e térmico). -----	44
Tabela 10 – Resultados dos ensaios de rugosidade aos ladrilhos antimicrobianos e ao ladrilho só com aplicação do vidrado K. -----	45
Tabela 11 - Resultados dos ensaios de resistência química de acordo com a norma ISO 10545-13 [38], dos ladrilhos com aplicação dos vidrados K e dos ladrilhos antimicrobianos (pastas cinza escuro e preta, ambas com vidrado K e tratamento térmico). -----	46

Tabela A-1 - Valores médios dos testes antimicrobianos realizados com os ladrilhos. --- 56

1. Introdução

1.1. Enquadramento

Os últimos dados do Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção Associada aos Cuidados de Saúde – PNCI – sobre a prevalência de infecções em meio hospitalar indicam que 8,4 em cada 100 portugueses desenvolvem uma infecção associada aos cuidados de saúde [1]. Normalmente este tipo de contaminação é minimizado pelos intensivos programas de esterilização e limpeza com diversos compostos químicos como o hipoclorito de sódio, o etanol e os sais de amónio, entre outros.

Contudo, a existência de microrganismos patogénicos não é só característica dos meios hospitalares e, quando as estatísticas revelam que nos ambientes doméstico e escolar existe um número assustador de unidades de colónias de bactérias (UFC) por cada metro cúbico (Fig. 1), a possibilidade de ter superfícies antibacterianas como obstáculo ao crescimento de bactérias torna-se uma solução bastante atractiva.

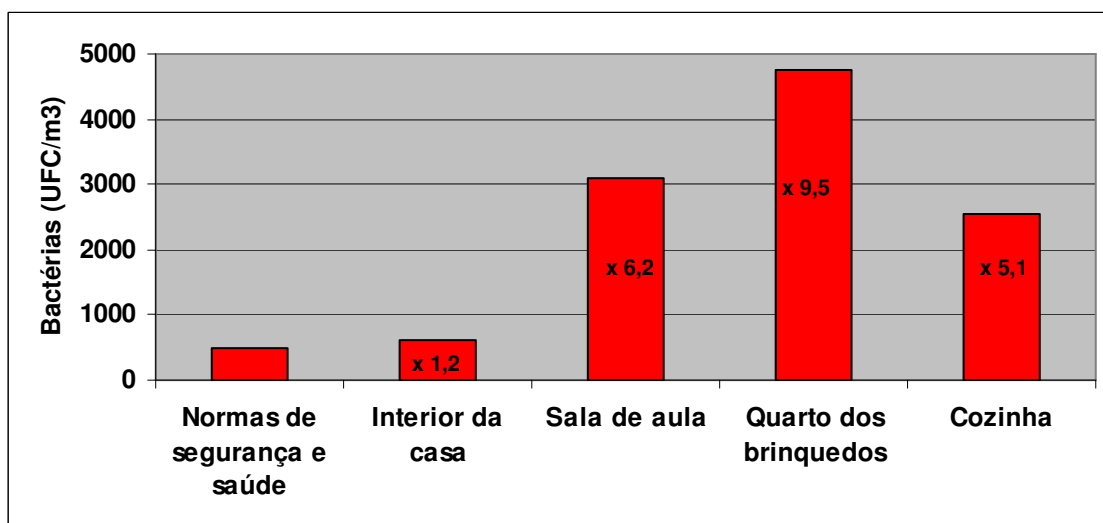


Figura 1 – Número médio de bactérias, em unidades formadoras de colónias (UFC) por metro cúbico (m^3), existente em diversos ambientes [2].

Neste sentido, torna-se imperioso o desenvolvimento de soluções cerâmicas, nomeadamente pavimentos e revestimentos em grés porcelanato, que sirvam de obstáculo a

este tipo de infecções, não só para aplicações hospitalares, mas também para a indústria alimentar, residências e escolas.

A capacidade de higienizar um pavimento ou um revestimento cerâmico em grés porcelanato é um dos requisitos mais difíceis de cumprir, devido à complexidade das reacções físico-químicas que ocorrem entre a superfície e as sujidades que se acumulam e durante a respectiva limpeza. Em contrapartida, é ao produto cerâmico que o conceito de antimicrobiano se aplica melhor, devido às suas características técnicas: ínfima absorção de água e elevadas resistências química, ao manchamento, e mecânica (abrasão e flexão).

1.2. A actividade antimicrobiana da prata

A prata (do latim vulgar *platta*, *argentum*) é um elemento químico que à temperatura ambiente se encontra no estado sólido. É um metal de transição macio e lustroso que pode ocorrer naturalmente na sua forma pura (prata nativa), em ligas com ouro e outros metais e em minerais dos quais se destaca a argentite (Ag_2S). A maior parte da prata é um subproduto da mineração do cobre, ouro, chumbo e zinco.

O seu estado de oxidação mais comum é o +1 (por exemplo, como ocorre no nitrato de prata: AgNO_3); no entanto também pode apresentar outros estados de oxidação (+2 e +3), nomeadamente sob a forma de fluoreto de prata (II): AgF_2 e tetrafluoreto de potássio de prata (III): $\text{K}(\text{AgF}_4)$.

O efeito antimicrobiano da prata é conhecido desde a antiguidade. Já as civilizações greco-romanas observaram que as algas não se desenvolviam em recipientes de cobre e de prata que continham água para consumo humano, ao contrário do que se verificava nos recipientes de barro.

Essa acção foi denominada por Pelkzar et al. [3] como efeito oligodinâmico e foi definido como sendo a capacidade que pequenas quantidades de certos metais têm para exercer um efeito letal sobre as bactérias.

Uma das questões de interesse ambiental e de saúde que se coloca é o da toxicidade no uso dos metais pesados. De acordo com os trabalhos desenvolvidos por Goetz [4], a prata é o menos tóxico do grupo dos metais pesados para as formas de vida macroscópicas, não tendo qualquer contra-indicação quando utilizada em baixas concentrações. Em 1971,

Lukens [5] provou que a fungotoxicidade, dentro de um mesmo grupo da tabela periódica, aumenta com o incremento do peso atómico, sendo a prata e o ósmio os elementos mais tóxicos para os seres microscópicos.

Em particular, a prata e os seus sais têm uma intensa actividade antimicrobiana, sendo por isso utilizados no tratamento da água ou colocados numa matriz orgânica para usos diversificados, desde roupas a dispositivos médico-cirúrgicos [6].

Os mecanismos da acção antimicrobiana dos iões de prata estão intimamente relacionados com o grupo tiol (sulfidril – SH) [5-10], que é constituído por proteínas, que por sua vez são as responsáveis pela actividade enzimática.

Os aminoácidos, como a cisteína e outros componentes contendo grupos tiol, como o tioglicolato de sódio, neutralizam a actividade da prata contra as bactérias [11]. Por contraste, os aminoácidos contendo ligações bissulfida (SS), os aminoácidos não sulfidados e os compostos contendo enxofre, não conseguem neutralizar a actividade dos iões de prata. Estas e outras descobertas sugerem que a interacção dos iões de prata com os grupos tiol, nas enzimas e nas proteínas, desempenham um papel essencial na acção microbiológica, tal como outros componentes celulares [9].

A adição de iões de prata a um meio contendo bactérias provoca a libertação dos iões fosfato da bactéria. Deste modo, o plasma da bactéria ou a sua membrana citoplasmática, que está associada a importantes enzimas, torna-se um alvo para os iões de prata [12].

1.3. A bactéria *Escherichia coli*

1.3.1. Generalidades

O nome deste género de bactéria provém do seu descobridor, Theodor Escherich, médico austríaco, que viveu nos finais do século XIX.

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria bacilar Gram-negativa não formadora de esporos, em forma de bastão. Pertence à família das *Enterobacteriaceae*, cujo habitat natural é o lúmen intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. Esta bactéria é um dos poucos seres vivos capazes de produzir todos os seus constituintes a partir de compostos básicos e fontes de energia suficientes. Uma das suas principais

características é possuírem fímbrias ou adesinas, que permitem a sua fixação impedindo que sejam arrastadas pela urina ou pelas fezes.

Cada pessoa evacua em média um trilião de bactérias *E. coli* diariamente. Por este motivo, a sua presença na água ou nos alimentos é indício de contaminação com fezes humanas (ou, mais raramente, de outros animais). A quantidade de *E. coli* em cada mililitro de água é uma das principais medidas usadas no controlo da higiene da água potável municipal, preparados alimentares e águas de piscinas e é conhecido como o índice coliforme da água. Esta bactéria é a responsável por gastroenterites, infecções do tracto urinário, colecistites, apendicites, peritonites, meningites, infecções em feridas e septicemias [13].

1.3.2. Interacção com o ião prata

Os efeitos provocados pela adição de iões de prata às enzimas bacterianas da *E. coli*, são a inibição do crescimento da bactéria e a deposição de iões de prata nos vazios e nas paredes da célula sob a forma de precipitados, como se pode observar por microscopia electrónica de transmissão (TEM) (Fig. 2) [14].

A célula da bactéria aumenta de tamanho e a membrana citoplasmática, o conteúdo citoplasmático e outras camadas da célula apresentam anomalias na estrutura. Por fim, os iões de prata interagem com os ácidos nucleicos, fazendo com que a bactéria perca a sua capacidade de reprodução e, deste modo, limita-se a sua proliferação (Fig. 3) [14].

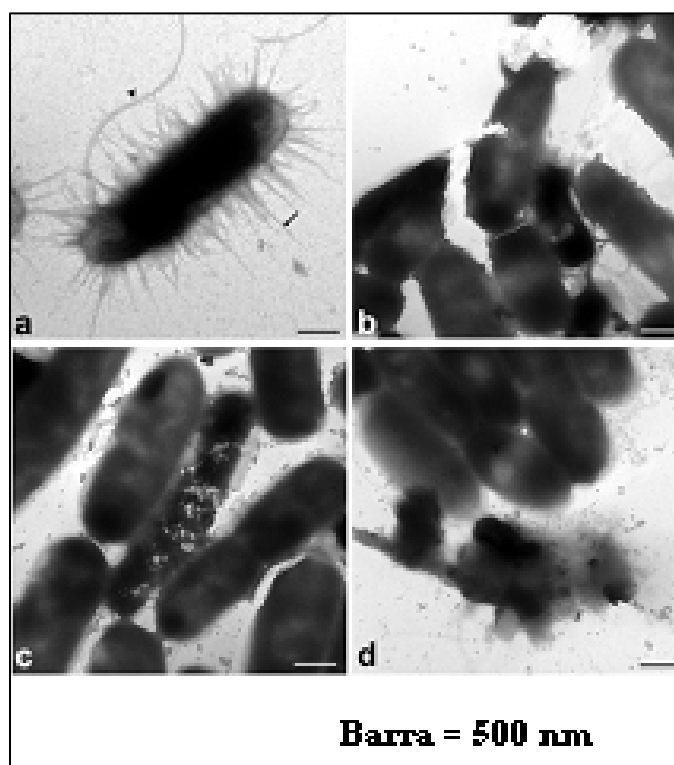


Figura 2 – Morfologia da bactéria *E. coli*, observada por TEM: (a) Bactéria não tratada; (b, c e d) Bactéria tratada com uma solução de iões de prata (0,2 ppm), em que é visível em (b e d) o seu estado de degradação e (c) os precipitados no interior da mesma [14].

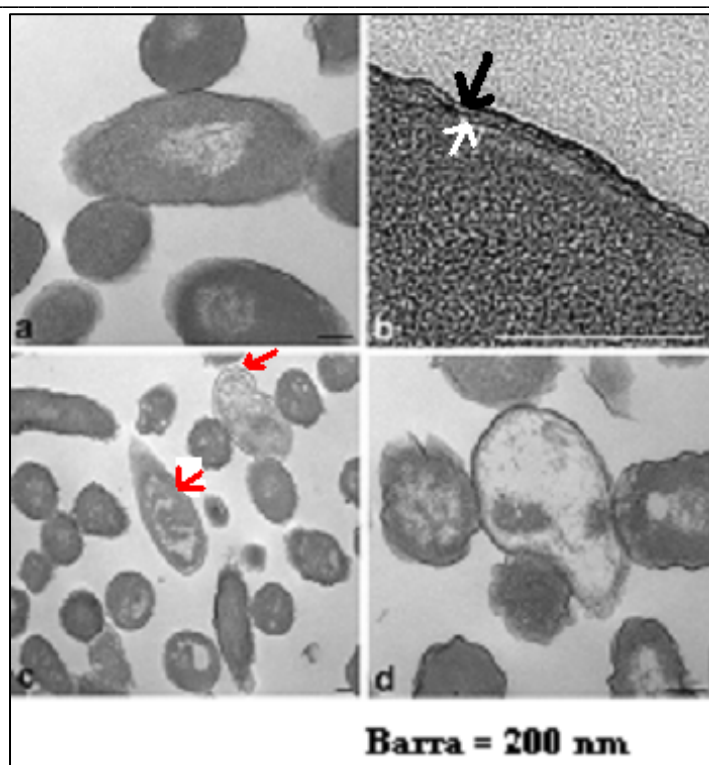


Figura 3 – Estrutura interna da *E. coli* observada por TEM: (a e b) Bactéria não tratada; (c e d) Bactéria tratada com uma solução de 0,2 ppm de iões de prata. As setas em (b) indicam a membrana externa (seta preta) e a membrana citoplasmática do exterior da célula (seta branca). As setas vermelhas em (c) indicam a separação da membrana celular a partir da parede celular [14].

1.4. A bactéria *Staphylococcus aureus*

1.4.1. Generalidades

A *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é uma bactéria Gram-positiva e é das espécies patogénicas mais comuns, juntamente com a *E. coli*. Caracteriza-se por ter uma forma esférica (cocos), com cerca de um micrómetro de diâmetro, e forma grupos com o aspecto de cachos de uvas de cor amarelada, devido à produção de carotenoides. Daí também ser conhecida por “estafilococo dourado”.

Esta bactéria é responsável por inúmeras doenças, tais como a síndrome de choque tóxico, a gastroenterite estafilocócica, a síndrome de pele escaldada estafilocócica, o impetigo, a foliculite, a endocardite, a osteomielite e a pneumonia [15].

1.4.2. Interação com o ião prata

Uma bactéria *S. aureus* de boa saúde apresenta a parede e membrana celular intactas, uma camada peptidoglicana bem preservada, assim como a membrana citoplasmática (Fig. 4a e b).

Quando são tratadas com iões de prata, o seu aspecto altera-se drasticamente. As paredes e as membranas apresentam-se bem separadas e danificadas, devido a ruptura, resultando na posterior libertação do seu conteúdo celular no meio circundante. Ocorre também uma diminuição da densidade e da heterogeneidade do citoplasma (Fig. 4). É comum encontrar partículas densas ou precipitados à volta das células danificadas (Fig. 5b - d).

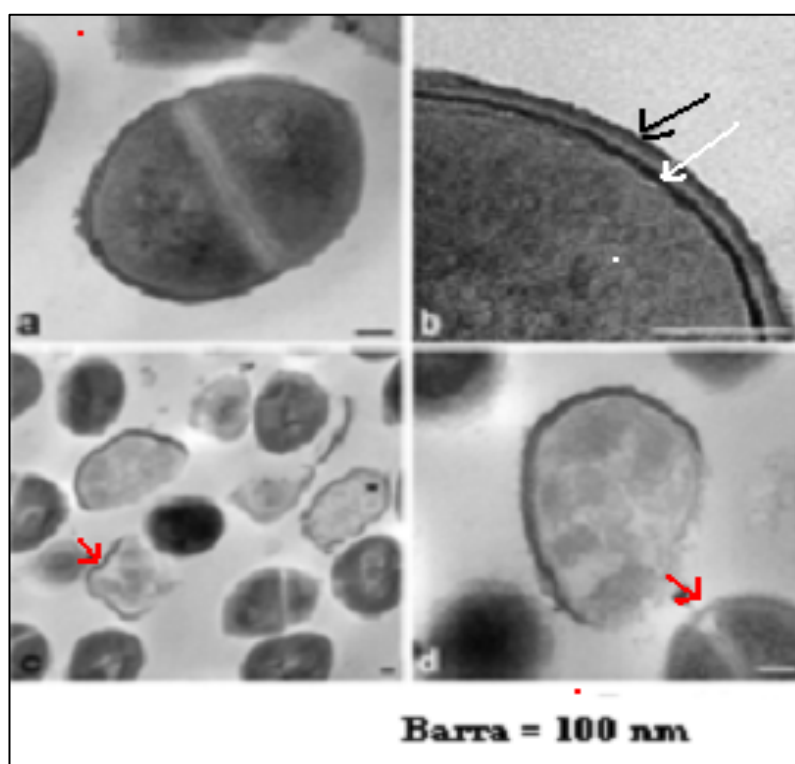


Figura 4 – Estrutura da *S. aureus* observada por TEM: (a e b) Bactéria não tratada; (c e d) Bactéria tratada com solução de 0,2 ppm de iões de prata. As setas pretas e brancas em (b) indicam a camada peptidoglicana e a membrana citoplasmática, respectivamente. As setas vermelhas em (c e d) indicam a separação da membrana celular da parede da célula [14].

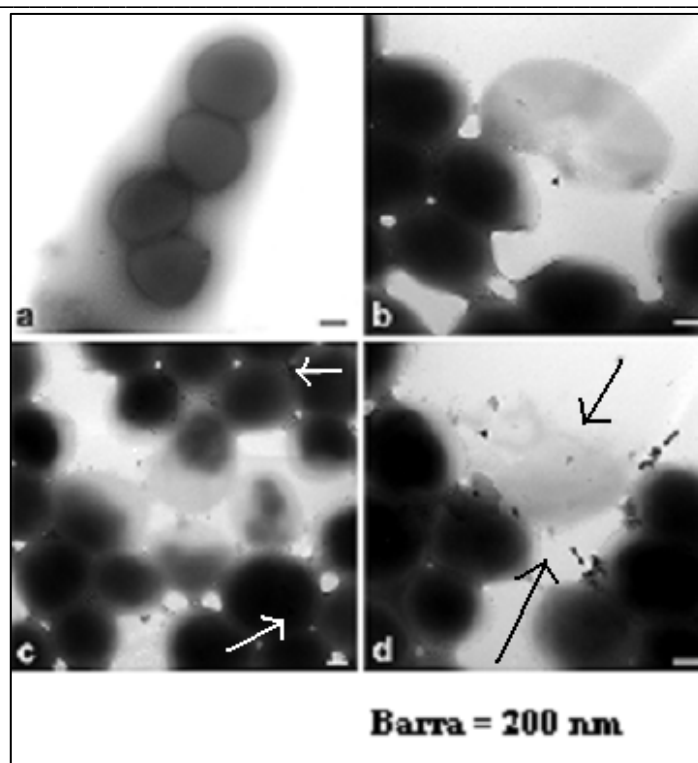


Figura 5 – Estrutura externa da *S. aureus* observada por TEM: (a) Bactéria não tratada; (b a d) Bactéria tratada com solução de 0,2 ppm de iões de prata. As setas brancas em (c) apontam os precipitados encontrados nas células danificadas. As setas negras em (d) indicam a libertação do conteúdo celular [14].

1.5. Principais diferenças e semelhanças entre a *E. coli* e a *S. aureus*

Diversos estudos [14,16,17] demonstraram que a prata, como agente antimicrobiano, é mais eficaz contra a *E. coli* do que contra a *S. aureus*. A principal razão para este facto, deve-se à espessura da camada peptidoglicana, que actua como protecção à acção destes iões (Fig. 6).

As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são constituídas por uma parede celular de peptidoglicano, uma bicamada de fosfolípido e têm proteínas inseridas na membrana. Contudo, as bactérias Gram-negativas têm uma única membrana externa constituída por polissacarídeos, lipoproteínas e fosfolípidos. Na sua estrutura há um espaço periplásmico localizado entre a camada de peptidoglicano e a membrana citoplasmática, onde ocorre a produção de certas enzimas que conferem maior resistência à bactéria.

Porcelanato extrudido com acção antimicrobiana, antimancha e resistente quimicamente

As bactérias Gram-positivas possuem paredes com cerca de vinte vezes mais peptidoglicano que as Gram-negativas, o que as torna mais sensíveis aos agentes antimicrobianos. Esta espessa matriz de peptidoglicano, ácido teicóico, polissacarídeos e outras proteínas têm várias funções incluindo a regulação do transporte, da expansão e da formação da célula.

Estudos efectuados por diversos autores [14,17-19] revelaram que nas células das bactérias *E. coli* e *S. aureus* ocorrem fenómenos semelhantes. Isto é, após o seu tratamento com o ião prata, a membrana citoplasmática encolhe e separa-se da parede da célula, libertando os conteúdos citoplasmáticos através da parede degradada da célula.

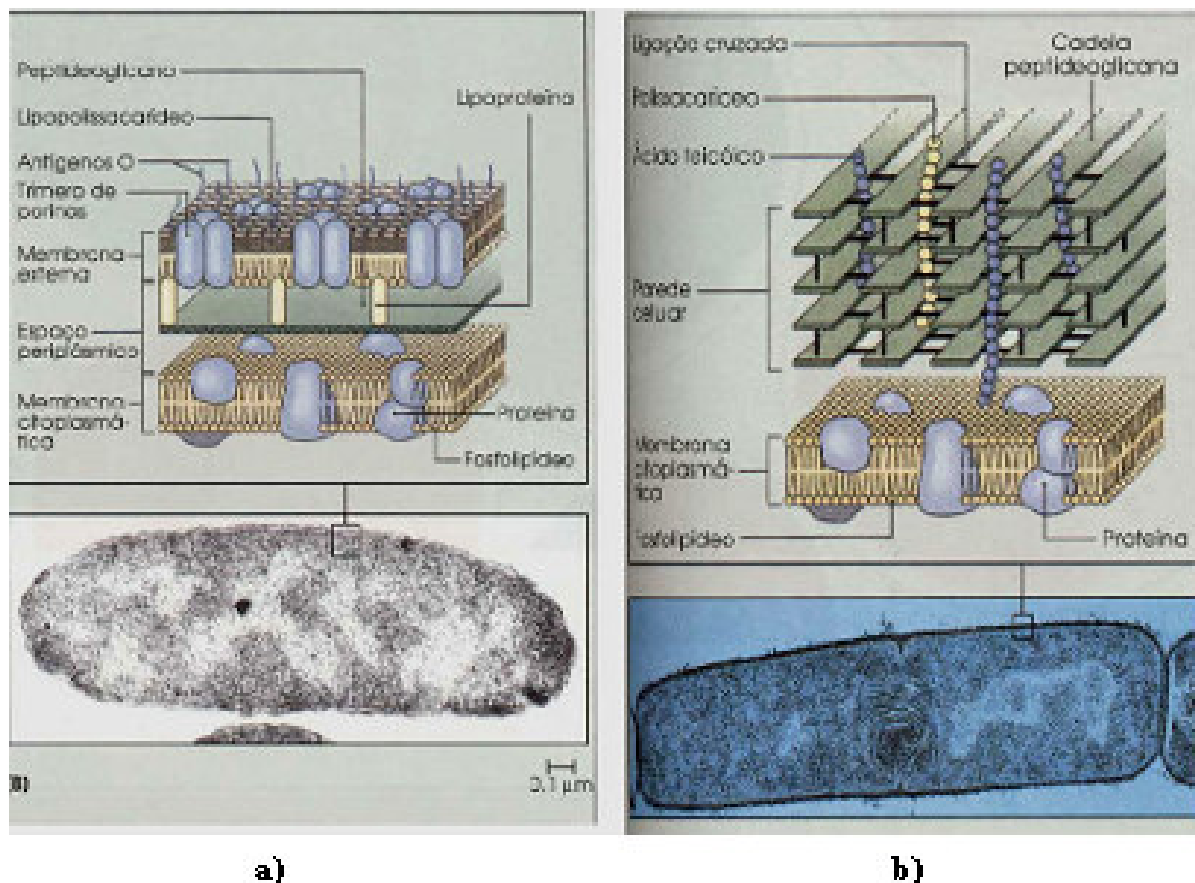


Figura 6 – Representação esquemática das diferenças entre a estrutura fina da parede celular das bactérias Gram-positivas (b), como é o caso da bactéria *S. aureus* e da estrutura mais espessa das bactérias Gram-negativas (a), como é o caso da bactéria *E. coli* [5].

1.6. A influência do ferro e do crómio na inibição do crescimento da *E. coli*

O elemento crómio foi descoberto em 1797, pelo químico francês Louis Vauquelin e foi designado de crómio, do grego “chromos” (cor), devido às diferentes cores que apresentavam os seus compostos. O crómio é um metal de transição, duro, frágil, de coloração cinza semelhante ao aço. É muito resistente à corrosão. O principal minério de crómio é a cromite de ferro ou dicromato de ferro, FeCr_2O_4 , encontrada maioritariamente na África do Sul, onde existem 96% das reservas mundiais. Outras fontes menos comuns de crómio incluem o cromato de chumbo, PbCrO_4 , e o óxido de crómio (III), Cr_2O_3 . As pedras preciosas esmeralda e rubi devem a sua cor a quantidades vestigiais de crómio [20]. O ião crómio é considerado biologicamente importante para todos os níveis dos organismos vivos. Juturo e Komorowski [21] demonstraram que o crómio trivalente tem um papel importante no controlo do metabolismo dos hidratos de carbono e dos lipídios nas células. Apesar de provocar a inibição do crescimento bacteriano e a diminuição da patogenicidade o ião de crómio pode interagir com o ferro no metabolismo dos organismos vivos [22].

O ferro (do latim *ferrum*) é um elemento químico, que à temperatura ambiente, se encontra no estado sólido e é o quarto elemento mais abundante da crosta terrestre (aproximadamente 5%). É extraído da natureza sob a forma de minério de ferro que, depois de passado para o estágio de ferro-gusa através de processos de transformação, é usado na forma de lingotes. Actualmente, é utilizado extensivamente para a produção de aço e ligas metálicas, como elemento estrutural, e uma infinidade de outras aplicações, incluindo pigmentos cerâmicos à base de óxido de ferro. Encontra-se na natureza fazendo parte da composição de diversos minerais, entre eles muitos óxidos, como o FeO (óxido de ferro II, ou óxido ferroso) ou como Fe_2O_3 (óxido de ferro III, ou óxido férrico). Raramente é encontrado livre. Para se obter ferro no estado elementar, os óxidos são reduzidos com carbono, e imediatamente submetidos a um processo de refinação para retirar as impurezas presentes [23]. O ferro é um nutriente essencial para as formas de vida devido à sua actividade no transporte dos electrões nas reacções dos sistemas biológicos. Contudo, a sua insolubilidade e reactividade, originam, respectivamente, problemas de disponibilidades e toxicidade nas células das bactérias [24]. Uma vez que o ferro é insolúvel no pH

fisiológico das bactérias, estas desenvolveram mecanismos para o transportar e armazenar nas proteínas. Desta forma, as bactérias elaboram e segregam óxido férrico para o exterior. O ferro extracelular não é a única fonte disponível de ferro. Muitas bactérias têm reservas intracelulares de ferro armazenadas nas proteínas. Estas reservas podem ser usadas para regular o crescimento da célula quando as reservas exteriores são reduzidas. Os agentes patogénicos utilizam frequentemente baixas quantidades de ferro provenientes do exterior como sinal de indução de virulências dos genes. Por outro lado, elevadas quantidades de ferro são extremamente tóxicas e podem conduzir a efeitos antimicrobianos desta substância [22].

Kalantari e Ghaffari [22] avaliaram a influência do crómio e do ferro no crescimento da bactéria *E. coli*. Para o efeito prepararam culturas destas bactérias, às quais adicionaram soluções contendo iões (Cr^{3+} , Fe^{2+} e Fe^{3+}). A cultura foi mantida a 37°C durante 5 horas e o crescimento das bactérias foi avaliado, de meia em meia hora, com auxílio de um espectrofotómetro. Os ensaios foram efectuados em triplicado e comparados com um controlo (cultura de bactérias sem adição de nenhuma solução).

Estes autores [22] verificaram que a presença do ião Cr^{3+} tem um efeito inibitório no crescimento da bactéria *E. coli*. Quando em contacto com soluções com 0,1 e 0,5 mM/L de iões de crómio, o crescimento reduz-se para 77% e 38%, respectivamente. Pelo contrário, a adição de soluções com baixas concentrações (0,1 e 0,5 mM/L) de Fe (II) e (III) não promove a inibição do crescimento das bactérias *E. coli*. A adição de soluções de ferro com uma concentração mais elevada (1 mM/L) promoveu a redução do crescimento das bactérias. O Fe(III) reduziu-o para 31.3% e o Fe(II) inibiu-o completamente [22].

Kalantari e Ghaffari [22] verificaram ainda que a acção conjunta de iões de ferro e crómio é extremamente eficaz na inibição do crescimento da *E. coli*. A adição, ao meio de cultura, de uma solução com 0,1 mM/L de Fe^{3+} e Fe^{2+} e 0,5 mM/L Cr^{3+} promove uma inibição drástica do crescimento das bactérias o qual foi de apenas 8%. Assim, a adição da solução de Fe^{3+} e Fe^{2+} (0,1 mM/L) à de Cr^{3+} (0,5 mM/L) induziu uma redução do crescimento das bactérias de 38% para 8%. Pelo contrário, o crescimento da *E. coli* foi de 74.3% quando cultivada numa solução com 1 mM/L de Fe^{3+} e 0,1 mM/L Cr^{3+} (Fig. 7).

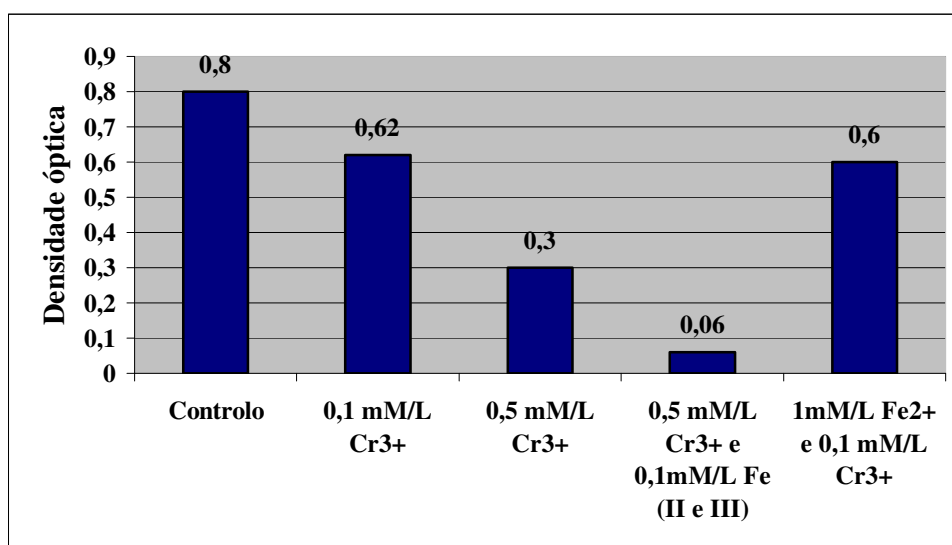


Figura 7 – Efeitos do Cr^{3+} e da interacção entre este ião e os iões Fe^{2+} e Fe^{3+} na taxa de crescimento da bactéria *E. coli* após 3,5 horas de incubação a 37°C. Cada resultado representa três experiências independentes [22].

Os resultados obtidos por estes investigadores [22], demonstram que elevadas concentrações de Fe^{2+} inibem o crescimento das bactérias. O crómio, apesar de ser apenas parcialmente inibitório quando actua isolado, combinado com o ferro torna-se letal para a *E. coli* pois os sais de crómio vão promover a precipitação do ferro no interior da célula, causando a sua morte.

Neste trabalho vai-se estudar o efeito da presença simultânea de crómio e ferro na pasta de porcelanato extrudido na actividade antimicrobiana do material (bactérias *E. coli* e *S. aureus*). A influência do ião prata também foi estudada tendo-se para tal aplicado, sobre as peças cozidas, uma solução de nitrato de prata e nitrato de sódio. Estas peças foram posteriormente sujeitas a um tratamento térmico.

1.7. Vidrados

1.7.1. Função

Os vidrados usam-se para revestir os suportes cerâmicos, como é o caso dos pavimentos e revestimentos, e têm funções funcionais/técnicas e estéticas.

A aplicação de um vidrado permite tornar a superfície do material completamente impermeável e, por consequência, promover uma limpeza fácil de todos os agentes causadores de sujidades e manchas. Pode ainda conferir ao material outras características técnicas, nomeadamente elevada resistência à abrasão, ao escorregamento (material anti-derrapante), ao ataque químico, etc.

Em termos estéticos permite a obtenção de diversos efeitos, como texturas, brilhos, mistura de cores e tonalidades, que de outra forma dificilmente se conseguiriam obter.

1.7.2. Preparação e aplicação

As fritas cerâmicas, que são a base principal da composição dos vidrados, são vidros preparados a partir de matérias-primas naturais, que após fusão a temperaturas da ordem dos 1500°C (dependendo da sua composição), são sujeitas a um arrefecimento brusco (em água ou em ar) para manterem a sua estrutura vítrea [25]. As fritas podem ser utilizadas sozinhas ou misturadas com outros componentes (matérias primas minerais, corantes, aditivos químicos), dando origem ao vidrado. Este pode ser aplicado por via húmida ou seca, sobre o suporte cerâmico.

No caso da via húmida os componentes do vidrado são moídos (com água) num moinho de bolas até que as partículas tenham um tamanho inferior a 40 µm [25]. A suspensão é então aplicada sobre o suporte cerâmico, que poderá estar ou não recoberto com engobe. Este tem uma composição intermédia entre o vidrado e a pasta cerâmica o que permite uma transição gradual das características. Uma parte da água da suspensão evapora e outra parte é absorvida pelo suporte, formando-se uma camada consolidada de partículas sobre o mesmo, que a seguir vai a cozer.

Este método é utilizado na aplicação de engobes, esfumaturas e vidrados de cobertura. A suspensão pode ser depositada com campânula, disco ou aerógrafo.

Nas aplicações por via seca, a frita ou uma mistura de diversos componentes sob a forma de pó, granilha ou granulados, é aplicada sob o suporte cerâmico previamente recoberto por uma camada de engobe, vidrado, ou ligante orgânico, que tem como objectivo reter as partículas que são depositadas.

1.7.3. Vitrificação

A aplicação de um vidrado promove a formação de uma camada de partículas aglomeradas. Entre elas existem vazios ou interstícios, resultantes do seu empacotamento, que devem ser eliminados durante o processo de cozedura [26]. Inicialmente os poros são irregulares e estão separados, porém, durante a sinterização, o seu tamanho e formato alteram-se devido ao fluxo viscoso que se desenvolve nos materiais vítreos [27,28].

A sinterização, por fluxo viscoso, inicia-se à temperatura de amolecimento do vidrado, ou seja, a uma temperatura inferior à temperatura de fusão, sendo geralmente favorecida pelo seu aumento, quando não ocorre cristalização [29]. À medida que a temperatura do sistema aumenta, as partículas vítreas amolecem e começa a formar-se uma fase líquida. A força capilar que o líquido formado exerce sobre as partículas sólidas faz com que elas se reordenem originando um empacotamento mais eficiente, deixando que o líquido preencha e/ou elimine os pequenos poros existentes entre elas. A pressão capilar dos poros mais pequenos é consideravelmente maior do que a exercida pelos poros maiores, motivo pelo qual estes últimos só serão eliminados mais tarde [30].

Com o incremento da temperatura, a proporção de fase líquida continua a aumentar e a sua viscosidade a diminuir, o que permite o aumento da taxa de densificação até um valor máximo, mesmo que nem todos os poros tenham sido eliminados. Um aumento posterior da temperatura e/ou do ciclo de cozedura pode originar defeitos, porque promove o aumento do tamanho dos poros residuais devido ao incremento da pressão exercida pelo gás aprisionado no seu interior. Pode assim ocorrer inchamento do conjunto [30].

1.8. Troca iónica

A troca iónica é uma técnica muito utilizada para modificar a composição química dos vidros e para ajustar, de modo controlado, propriedades que não se conseguem obter por outro processo.

De acordo com West [31], para um material sofrer uma reacção de troca iónica deve possuir determinadas características estruturais. A mais importante é o grau de abertura da estrutura o qual está directamente relacionado com a facilidade com que os átomos ou iões estranhos se difundem na rede.

A prata é uma das espécies mais actuautes nas superfícies para modificar as propriedades físicas e químicas do material. O ião de prata modifica as propriedades ópticas, eléctricas e mecânicas. A magnitude das alterações está relacionada com a distribuição e concentração da prata e a forma em que está presente na estrutura do vidro [32].

Os parâmetros que afectam o processo de troca iónica e alteram a forma dos perfis de concentração incluem a composição, a fonte de prata, a temperatura e o tempo de troca iónica, além do uso ou não de um campo eléctrico [31].

Diversos estudos [31-33] indicam que o ião de sódio (Na^+) é a espécie mais facilmente trocável com os iões de prata (Ag^+) nos vidros e vidrados, isto porque ambos são monovalentes e possuem raios iónicos semelhantes.

Ahmed et al. [33] utilizaram a análise por micro-sonda antes e após troca iónica num vidro para verificar o comportamento dos iões de prata (Ag^+), sódio (Na^+), alumínio (Al^{3+}), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e potássio (K^+). Os resultados obtidos encontram-se nas figuras 8 e 9, nas quais se pode observar que as concentrações dos iões Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ são semelhantes, após a troca iónica. Pelo contrário, a concentração do ião Na^+ diminui e a do ião Ag^+ aumenta. Após troca iónica detectaram a presença de prata e verificaram que a sua concentração, tal como observado para o sódio, não é uniforme na direcção perpendicular à superfície (Fig. 9).

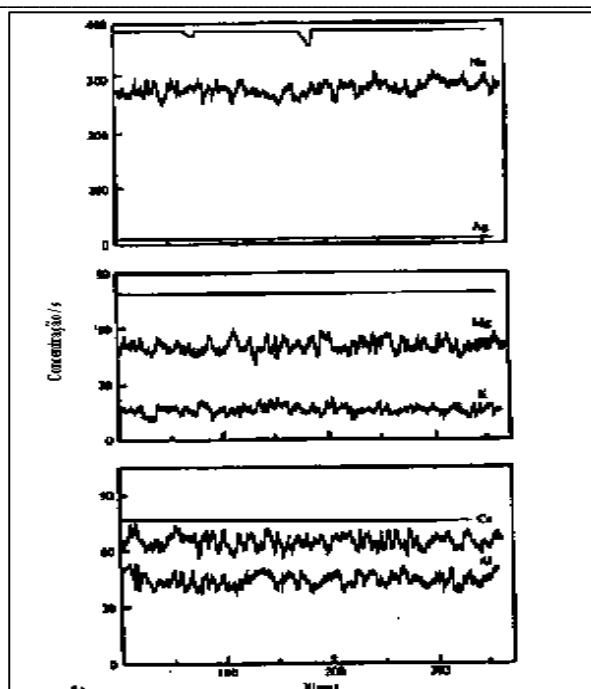


Figura 8 – Distribuição dos elementos no vidro antes da troca iónica na direcção perpendicular à superfície [33].

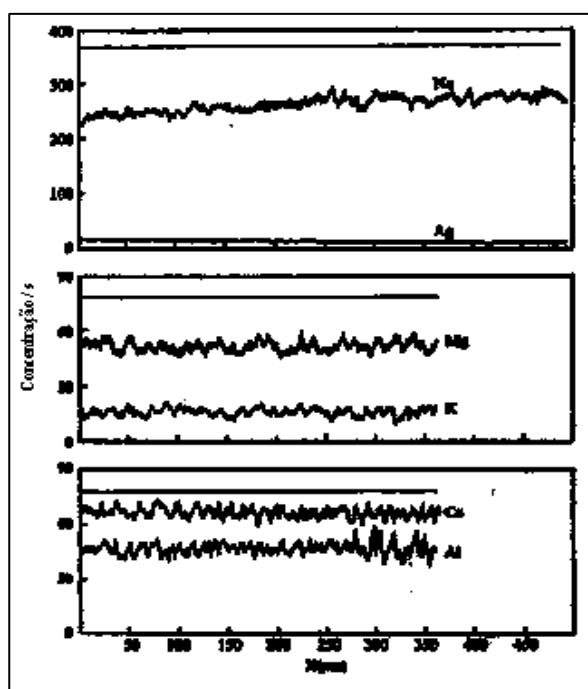


Figura 9 – Distribuição de elementos no vidro após a troca iónica na direcção perpendicular à superfície [33].

A acção antimicrobiana ocorre na superfície do material, logo a difusão dos iões de prata para o interior da camada vítrea indisponibilizará a sua interacção com os microorganismos. Estes só serão activos quando atingirem novamente a superfície do material o que dependerá de processos de difusão ou do desgaste superficial por acção de um agente mecânico ou químico. Deste modo, as condições em que se realiza o tratamento de troca iónica, nomeadamente o tempo e a temperatura, são extremamente importantes.

Amhed et al. [33] determinaram, para diversos tempos de troca iónica, o perfil de concentração da prata em função da profundidade do vidro (Fig. 10). Verificaram a concordância com modelo da difusão, ou seja, que a concentração aumenta com o incremento do tempo de troca iónica. A força motriz para a interdifusão da prata e do sódio, que se inicia na superfície entre o vidro e o banho de sais fundidos, é a existência de um elevado gradiente de concentração o qual possibilita a troca de posições entre os iões de prata e de sódio, pois estes possuem uma elevada mobilidade.

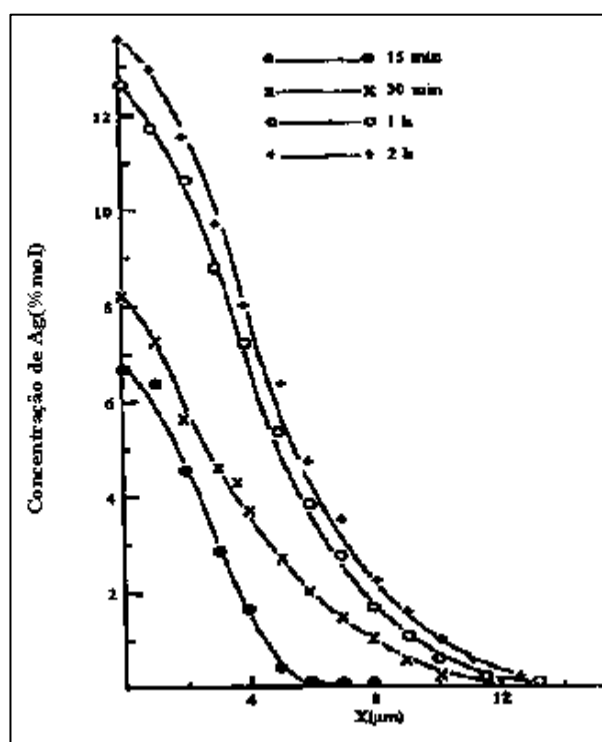


Figura 10 – Perfil de concentração da prata no vidro em função do tempo de tratamento químico [33].

O efeito da temperatura no processo de troca iónica encontra-se patente na figura 11. A concentração da prata na superfície do vidro e a profundidade de penetração aumentam com o incremento da temperatura [33].

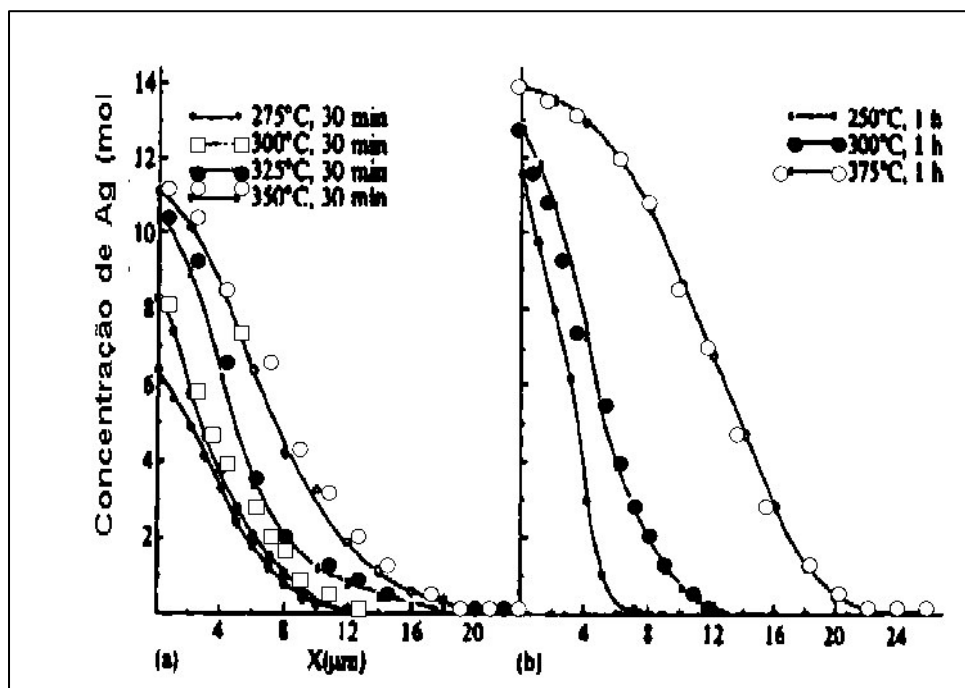


Figura 11 – Perfil de concentração da prata no vidro em função da temperatura do tratamento químico [33].

Angiolleto [32] também estudou detalhadamente a influência destes dois parâmetros (tempo e temperatura). Para tal: (i) fixou a temperatura (430°C) e variou o tempo (15-360 minutos) de permanência a esta temperatura; (ii) fixou o tempo (120 minutos) e variou a temperatura (300 e 520°C). Os resultados obtidos permitiram-lhe concluir que as condições óptimas para o tratamento térmico era a permanência do material duas horas à temperatura de 430°C. Para estas condições obteve uma concentração de prata de cerca de 4% numa profundidade de 25μm.

Angiolleto [32] provou que o único ião da rede vítrea capaz de efectuar troca iónica com a prata é o sódio. Para tal produziu dois vidros, um com e outro sem sódio na composição, os quais foram imersos num banho com iões Ag^+ e tratados termicamente a 430°C durante duas horas. A análise por micro-sonda comprovou que apenas o vidro que continha sódio

apresentava, após o ensaio, prata na sua composição. De acordo com o mesmo autor [32], após a troca iónica não deve ser feito mais nenhum tratamento térmico, uma vez que a prata passa da forma iónica para a forma metálica, reduzindo desta forma a sua acção antimicrobiana. Este fenómeno ocorre se o material for sujeito a uma temperatura superior a 450°C.

1.9. Porcelanato extrudido

1.9.1. Definição

A denominação grés porcelanato ou simplesmente porcelanato é suficiente para definir as origens e características deste produto. Na terminologia cerâmica, grés significa um material muito compacto, constituído por várias fases cristalinas dispersas numa matriz vítrea. O adjectivo porcelanato tem raiz etimológica no termo porcelana.

De acordo com a norma EN 14411:2006, anexo M, grupo AIa [34], os ladrilhos de grés porcelanato extrudido são caracterizados por serem conformados pelo processo de extrusão e por terem índices de absorção de água inferiores a 0,5%.

1.9.2. Características técnicas

O porcelanato é, de entre os materiais cerâmicos para pavimentação, o mais resistente à abrasão devido à sua elevada dureza superficial. Além disso, o empacotamento lamelar das partículas argilosas das matérias-primas, que ocorre durante o processo de extrusão, reduz a porosidade do produto final, favorecendo algumas características técnicas como a absorção de água muito reduzida e a elevada resistência mecânica.

Uma vez que o processo de extrusão exige a remoção da água de processamento após a conformação, as peças adquirem, durante a secagem, uma superfície mais acetinada do que no caso do porcelanato prensado. Uma vez cozido, o material exhibe uma elevada resistência aos agentes químicos e aos agentes manchantes.

1.9.3. Formatos e tipologia de produtos

A diversidade de formatos no porcelanato extrudido, tal como no prensado, é grande, incluindo formatos quadrados (10x10, 15x15, 20x20, 30x30 ou 40x40 cm, etc.) e formatos rectangulares (15x30, 60x30, 90x30 cm, e até mesmo superiores). A espessura varia entre 4,5 mm e 20mm (Fig. 12).

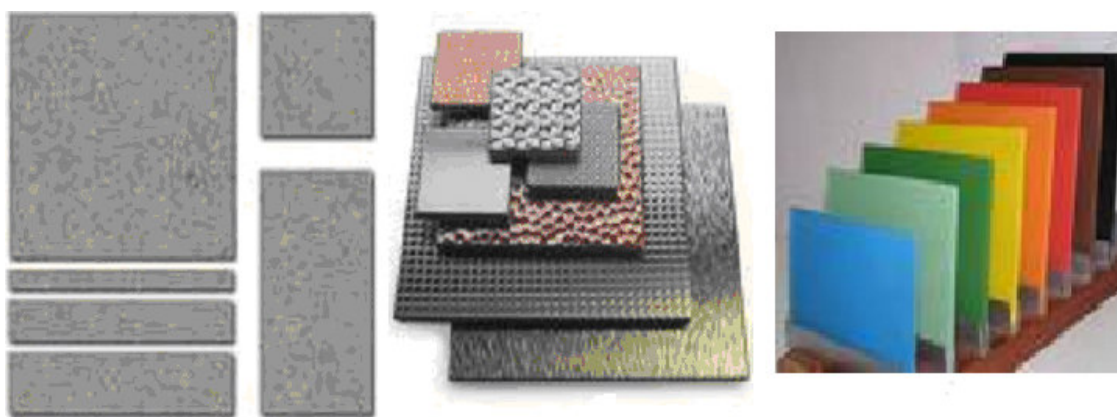


Figura 12 – Diversidade de formatos produzidos.

É a combinação dos aspectos técnicos e estéticos que determina se a colecção é destinada a aplicações residenciais, comerciais ou industriais. O porcelanato, que inicialmente era utilizado em aplicações industriais, é actualmente muito usado, no sector comercial em zonas de tráfego moderado e intenso, e em áreas residenciais.

A investigação aplicada tem permitido, sem comprometer as características técnicas do produto, individualizar as novas tipologias, introduzindo grandes diversificações no mercado e permitindo a difusão para sectores tradicionalmente orientados para produtos de elevado valor estético.

Os produtos podem ser classificados da seguinte forma:

Porcelanato extrudido com acção antimicrobiana, antimancha e resistente quimicamente

- Monocromáticos (Tinte Unite) – São produtos obtidos a partir de pós ou pastas uniformemente coloridos, sobre os quais predominando as cores pastel, e que podem ser comercializados naturais ou polidos (submetidos a um polimento superficial de modo a obter um aspecto brilhante) (Fig. 13).

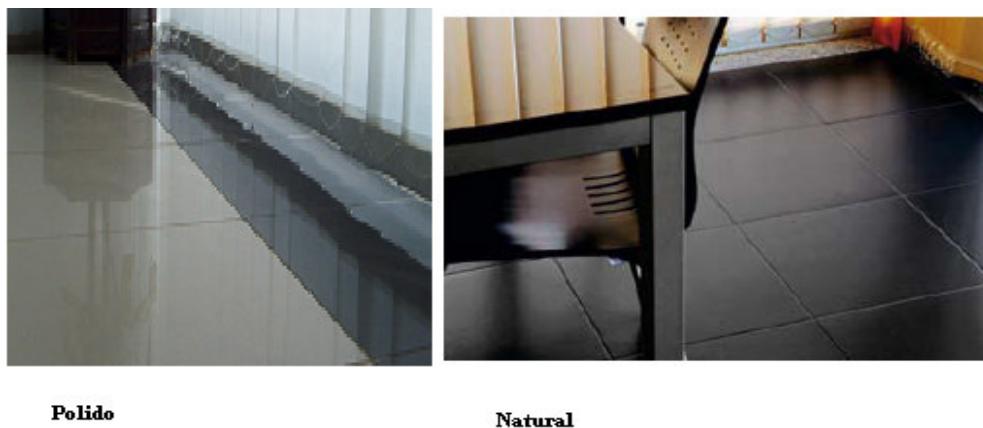


Figura 13 – Produto monocromático polido e natural.

- Granitos – São obtidos a partir da mistura de pós atomizados de várias cores ou de pastas coloridas com adição de granilhas, que dão origem ao efeito “sal e pimenta”. Muitas vezes o fundo é branco ou claro, reflectindo a cor natural da pasta sem a adição de corantes (Fig. 14).



Figura 14 – Gama de produtos com efeito “sal e pimenta”.

-
- Estruturados e destonalizados (*Abigarrados*) – Produtos obtidos a partir de uma mistura de pós corados (alguns micronizados conseguidos por trituração dos atomizados), que através da utilização de um sistema adequado de carga na prensas, se distribuem de uma forma um tanto ou quanto aleatória, dando origem a efeitos superficiais interessantes (Fig. 15).



Figura 15 – Produto estruturado e destonalizado.

Microgranitos – São obtidos a partir da mistura de pós atomizados com 10 a 15% de grânulos de grandes dimensões, preparados por regranulação, a seco ou a húmido, de pós atomizados ou micronizados (mono ou policromáticos). A superfície das peças apresenta um fundo cromático baseado no dos granitos, no qual se destaca a presença dos grânulos. Desta forma obtêm-se efeitos que reproduzem o aspecto de algumas pedras naturais (Fig. 16).

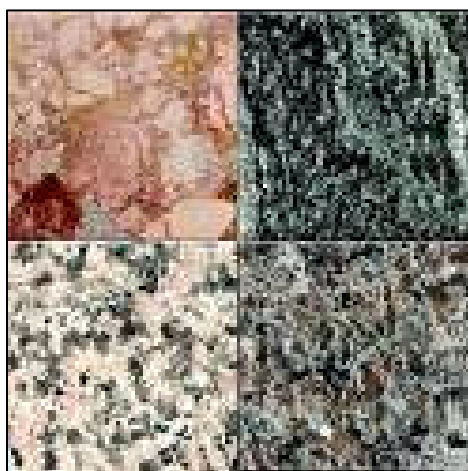


Figura 16 – Gama de produtos com microgranitos.

- Produtos obtidos através da decoração com vidrados e/ou sais solúveis - São obtidos por aplicação de vidrados (a disco ou aerógrafo) e/ou soluções (por serigrafia, aerógrafo ou disco), contendo sais solúveis de elementos cromóforos (Fe, Cr, Co, Mn, etc.) sobre as peças secas. Os efeitos estéticos alcançados são muito variáveis (Fig. 17).



Figura 17 – Produto obtido pela decoração com vidrado e sais solúveis.

- Rústicos estruturados e vidrados (fumados/serigrafados) – Produtos feitos a partir da pasta base prensada com cunhos estruturados (cunho com relevo), valorizados com aplicações de fumados (reduzida gramagem de esmalte corado que não é aplicado uniformemente em toda a peça) e/ou sais solúveis. Por vezes estas peças são escovadas de modo a retirar o material das partes com relevo mais elevado e a acumulá-lo nos baixos relevos. O efeito de envelhecimento é eficazmente conseguido (Fig. 18).



Figura 18 – Produto rústico estruturado e vidrado.

2. Metodologia

2.1. Caracterização da pasta de porcelanato extrudido

A pasta de porcelanato extrudido (*Aleluia Cerâmicas, S.A.*) foi caracterizada por:

- a) Espectrometria por fluorescência de raios X (*Philips X' UNIQUE*);
- b) Análise dilatométrica (*Netzch*), com uma velocidade de aquecimento de 10°C/min, de acordo com a norma DIN 51045.

2.2. Caracterização do vidrado K e do produto

O vidrado K (*Aleluia Cerâmicas, S.A.*) foi caracterizado através da:

- a) Espectrometria por fluorescência de raios X (*Philips X' UNIQUE*);
- b) Difracção de raios X (*Rigaku Geigerflex diffractometer*);
- c) Análise dilatométrica (*Netzch*), com uma velocidade de aquecimento de 10°C/min de acordo com a norma DIN 51045;

O produto final foi caracterizado pela:

- a) Determinação da percentagem de absorção de água, resistência mecânica, módulo de ruptura e resistência à abrasão profunda, de acordo com as normas ISO 10545-3, ISO 10545-4 e ISO 10545-6, respectivamente;
- b) Análise da resistência dos ladrilhos às manchas com e sem a aplicação do vidrado K, de acordo com a norma ISO 10545-14;

- c) Análise da resistência química dos ladrilhos com e sem a aplicação do vidrado K, de acordo com a norma ISO 10545-13;
- d) Determinação da rugosidade dos ladrilhos com e sem a aplicação do vidrado K (*Perthometer M1 Mahr*);
- e) Análise por microscopia electrónica de varrimento (MEV) (*Hitachi SU 70*) da superfície do ladrilho com e sem a aplicação do vidrado K.

2.3. Peças em porcelanato extrudido com aplicação dos vidrados

O principal desafio deste trabalho é, partindo da gama de pastas de porcelanato extrudido da *Aleluia Cerâmicas, S.A.*, desenvolver um produto com características antimicrobianas. Para tal, partiu-se das pastas que estavam em produção: natural (sem adição de corantes), cinza claro, cinza escuro e preto com, respectivamente, 0,3, 0,5 e 2,5% de pigmento preto de crómio e ferro.

A metodologia utilizada neste trabalho encontra-se descrita resumidamente na tabela 1.

A cada peça 15x30 cm seca foram aplicados, à pistola, 6 gramas de vidrado K ($\approx 130 \text{ g/m}^2$) com a densidade de 1280 g/l (estas são as condições normalmente utilizadas na *Aleluia Cerâmicas*). As peças foram cozidas num forno industrial de rolos (*Sacmi*), com um ciclo de 90 minutos e uma temperatura máxima de 1210°C.

Após cozedura prepararam-se amostras de 15x15 cm, às quais foi aplicada à pistola 0,5 g ($\approx 22 \text{ g/m}^2$) de uma solução com 98% em peso de NaNO_3 (*Merk*, com 99,5% de pureza) e 2% em peso de AgNO_3 (*ABCR*) com uma densidade de 1200 g/l. Estas peças foram sujeitas a um tratamento térmico num forno eléctrico (*Termolab*) durante 2h à temperatura de 430°C e com uma taxa de aquecimento de 7°C/min. Estas amostras foram designadas de KT.

Em seguida, prepararam-se amostras com 1x1 cm para efectuar ensaios da percentagem de redução e do teste de difusão em ágar às bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

Tabela 1 – Ensaios a realizar.

Pasta (peça 15x30 cm)	Vidrado	Tratamento químico e térmico		Ensaio antimicrobiano/ Bactéria	
		Com	Sem	Redução	Ágar
Natural	K	Sim	Sim	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> às amostras com tratamento químico e térmico
Natural	Sem	Não	Sim	<i>E. coli</i>	Não
Cinza escura (0,5% pigmento Fe-Cr)	Sem	Não	Sim	<i>E. coli</i>	Não
Cinza clara (0,3% pigmento Fe-Cr)	K	Sim	Sim	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> às amostras com tratamento químico e térmico
Cinza escura (0,5% pigmento Fe-Cr)	K	Sim	Sim	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> às amostras com tratamento químico e térmico
Preta (2,5% pigmento Fe-Cr)	K	Sim	Sim	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> às amostras com tratamento químico e térmico

2.4. Ensaios complementares

Efectuaram-se os seguintes ensaios complementares para os produtos em que se obtiveram melhores resultados antimicrobianos:

- Resistência química e às manchas de acordo com as normas ISO 10545-13 e ISO 10545-14 respectivamente;
- Observação da superfície antimicrobiana por microscopia electrónica de varrimento (MEV);

c) Determinação da rugosidade da superfície (*Perthometer M1 Mahr*).

2.5. Avaliação da actividade antimicrobiana

A avaliação da actividade antimicrobiana das amostras, foi realizada no *Molecular Microbiology Lab do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro*, através dos testes da difusão em agar e da percentagem de redução de bactérias (R), conforme a descrição pormenorizada nos anexos I e II, respectivamente.

Foram usadas estirpes bacterianas de referência pertencentes a colecções de cultura, e que são normalmente utilizadas como indicadores da susceptibilidade a agentes antimicrobianos. Por norma, usa-se uma espécie indicadora Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* NCTC 6871) e outra Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922), de forma a recolher informação sobre os dois grandes ramos bacterianos [35].

2.5.1. Teste de difusão em agar

O meio agarizado é aplicado uniformemente numa caixa de *petri* e, a partir de uma cultura bacteriana do organismo teste com 16 horas de crescimento, é preparada uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente 10^4 UFC/ml (UFC – Unidades Formadoras de Colónias) para inocular a superfície do meio de cultura. De seguida, as amostras são colocadas sobre a superfície do meio de cultura e incubadas a 37°C, durante 24 horas. Após incubação, o crescimento do organismo teste é verificado à volta e debaixo de cada amostra. A zona sem crescimento bacteriano (halo à volta da amostra) é medida desde a amostra até à frente de crescimento bacteriano, sendo considerada como *Zona de Inibição* [35].

2.5.2. Teste de redução (R)

Esta metodologia consiste na determinação do número de células viáveis de uma suspensão, após incubação com as amostras referenciadas. No teste de materiais com propriedades antimicrobianas ocorre uma redução do número de células viáveis, determinada por contagem das unidades formadoras de colónias (UFC) numa cultura bacteriana em meio sólido.

Esta redução (R) pode ser quantificada através da equação (1), permitindo assim a comparação das propriedades antimicrobianas de amostras diferentes.

$$R = (Co - C) \times 100 / Co \quad (1)$$

Co representa o número UFC no teste com a amostra de controlo e C traduz as UFC obtidas com o material em teste [35].

Para cada ensaio de redução foram efectuadas no mínimo cinco réplicas do ensaio, de forma a garantir a fiabilidade dos resultados, sendo estes analisados em termos de média.

3. Análise e discussão dos resultados

3.1. Caracterização da pasta de porcelanato extrudido

A pasta utilizada na *Aleluia Cerâmicas, S.A.* para produzir o porcelanato extrudido, possui a composição química média apresentada na tabela 2. Trata-se de uma pasta feldspática (de potássio) tal como convém na obtenção de produtos gresificados. O teor de carbonatos e de argilas é razoavelmente baixo, como é demonstrado pelo reduzido valor de perda ao rubro ($\approx 5\%$). A quantidade de argilas é a mínima necessária para assegurar a plasticidade do material, essencial para a obtenção de uma extrusão sem defeitos.

Tabela 2 – Composição química da pasta de porcelanato extrudido.

Componentes	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	CaO	MgO	Na ₂ O	K ₂ O	TiO ₂	MnO	P ₂ O ₅	P.R.*
% ponderal	66,20	19,42	1,06	0,65	< 0,50	2,02	2,36	0,38	< 0,30	> 0,50	4,91

*P.R. – perda ao rubro

O seu comportamento dilatométrico encontra-se patente na figura 19. O coeficiente de dilatação térmica linear entre 20 e 500°C é de $86,08 \times 10^{-7} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$. O amolecimento da pasta inicia-se por volta dos 1000°C ocorrendo então uma retracção abrupta resultante da presença de fase líquida.

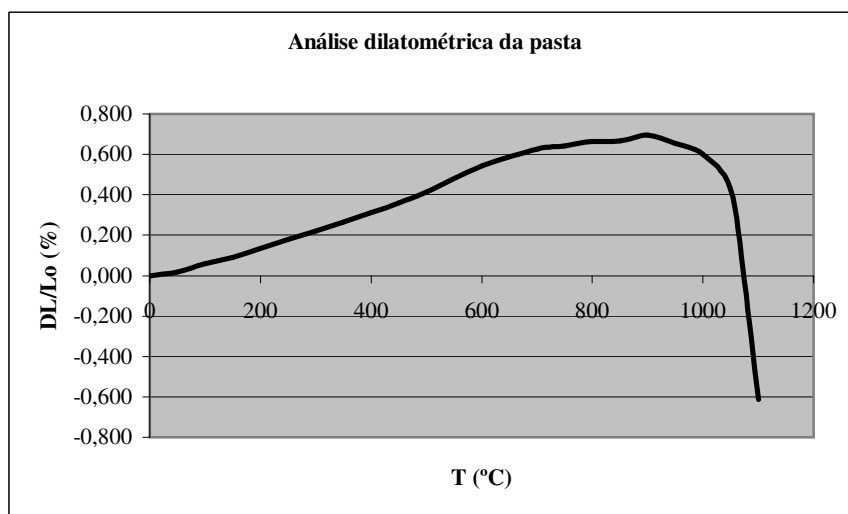


Figura 19 – Análise dilatométrica da pasta de porcelanato extrudido.

3.2. Caracterização do vidro K e do produto

Os ladrilhos em porcelanato extrudido apesar de apresentarem absorções de água inferiores a 0,5% (EN 14411:2006, anexo M - grupo AIa) [34], possuem na superfície alguma microporosidade aberta, que com o tempo acumula sujidades, muitas das quais impossíveis de remover (Fig. 20).

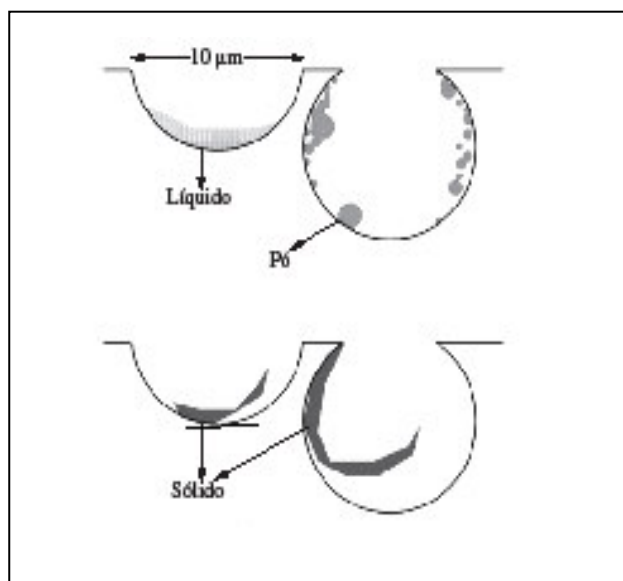


Figura 20 – Mecanismo de interação entre um microporo e a sujidade [36].

A aplicação, sob a forma de spray de pequenas quantidades do vidrado K nos ladrilhos de porcelanato extrudido, promove o alisamento da sua superfície durante o processo de cozedura, preenchendo os microporos, sem alterar as características estéticas do produto final, como o brilho ou a cor. Este facto pode ser comprovado através da análise da figura 21. Na microestrutura da superfície sem vidrado (Fig. 21 a) verifica-se a existência de porosidade superficial a qual é consideravelmente reduzida com a aplicação do vidrado K (Fig. 21 b).

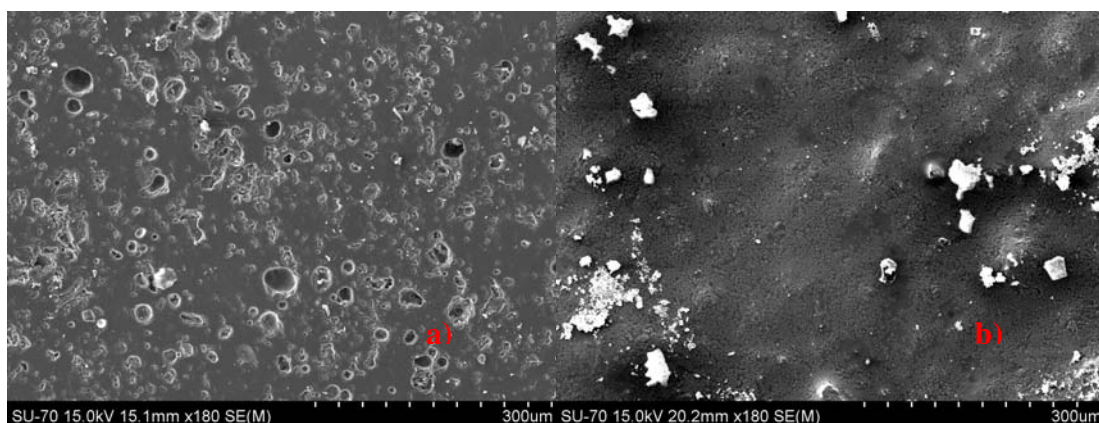


Figura 21 – Micrografia (MEV) das superfícies do ladrilho sem (a) e com (b) a aplicação do vidrado K.

A determinação da rugosidade superficial (*Perthometer MI Mahr*) permitiu confirmar que a rugosidade média das amostras (R_a) diminui cerca de 21% quando se aplica o vidrado K (tabela 3). A diferença entre as médias dos 5 pontos mais e menos salientes (R_z) exibiu um decréscimo de 8% e a altura máxima das irregularidades ($R_{máx}$) diminui mais de 12%.

Tabela 3 – Valores de rugosidade das superfícies sem e com a aplicação do vidrado K.

	Sem vidrado K	Com vidrado K
R_a (μm)	3,604	2,854
R_z (μm)	22,1	20,3
$R_{máx}$ (μm)	27,9	24,5

Na tabela 4 apresenta-se a composição química do vidro K, obtida por fluorescência de raios X. Este vidro possui apenas uma fase cristalina $\text{Ba}_{0,8}(\text{Al}_{1,6}\text{Si}_{2,4}\text{O}_8)$, como se pode observar no difractograma de raios X (Fig. 22).

O bário é um fundente de alta temperatura, introduzido na composição dos vidrados sob a forma de carbonato. A sua principal função é baixar o coeficiente de dilatação térmica, além de tornar o vidro mais lustroso e realçar as cores após cozedura.

Tabela 4 – Composição química do vidro K, determinada por FRX.

	SiO₂	Al₂O₃	BaO	CaO	Na₂O
% Ponderal	47,2	16,8	24,3	5,4	6,3

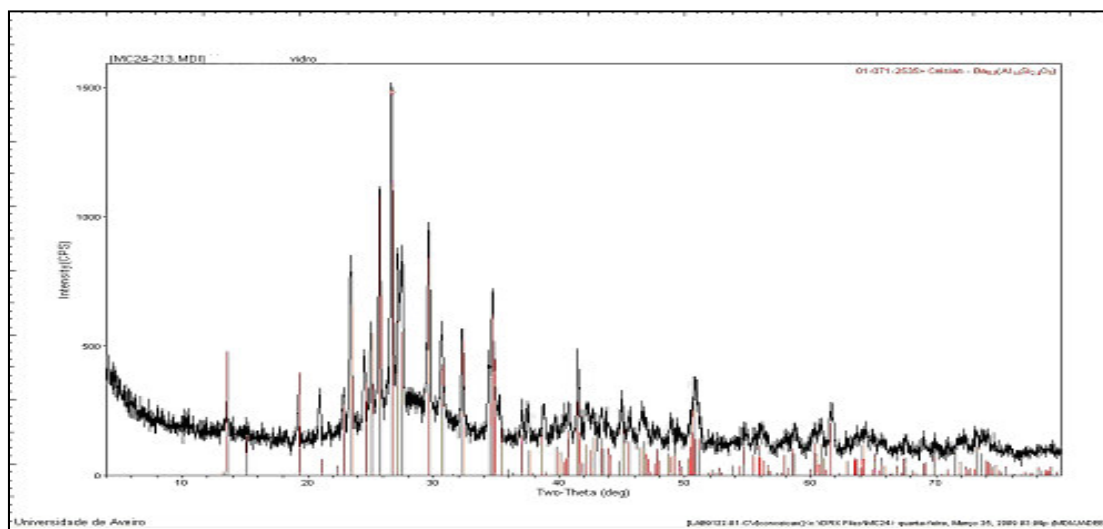


Figura 22 – Difractograma de raios X do vidro K.

O comportamento dilatométrico do vidro K está patente na figura 23. A sua temperatura de amolecimento é de 1080°C e tem um coeficiente de dilatação térmica linear, entre 20 e

500°C, de $64,62 \times 10^{-7} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$. Comparando o coeficiente de dilatação da pasta ($86,08 \times 10^{-7} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$) e do vidrado, verifica-se que o vidrado está ligeiramente à tracção. Neste caso não é um problema dado que a quantidade de vidrado aplicada é muito pequena (cerca de 130 g/m^2), pelo que não se forma uma camada coesa que poderia fendilhar. A principal função do vidrado é preencher a microporosidade existente na superfície das peças e a cobertura é mais perfeita se o vidrado ficar traccionado.

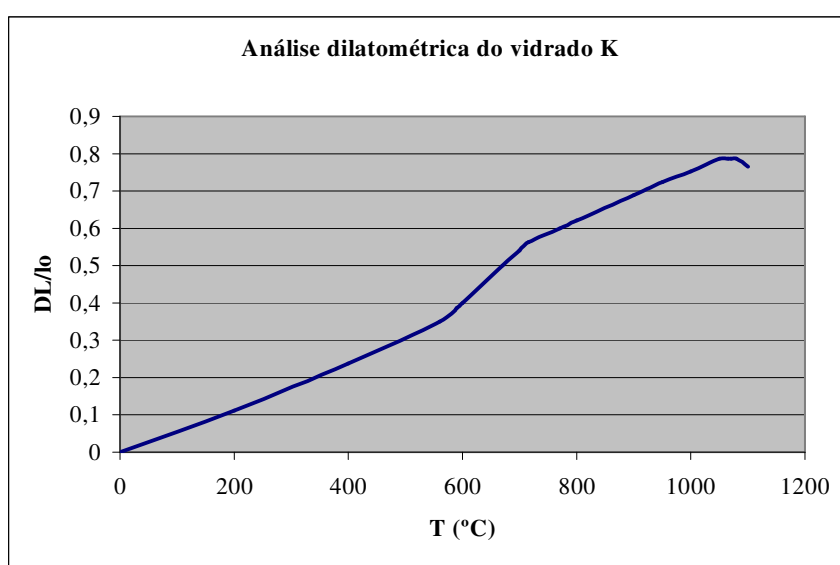


Figura 23 – Curva dilatométrica do vidrado K.

Na prática, a principal vantagem do produto com o vidrado K é a maior facilidade de limpeza, como se pode verificar pelos resultados dos ensaios de resistência às manchas, obtidos de acordo com a norma ISO 10545-14 [37] (Tabela 5). O material com vidrado K pertence à classe 5 a qual corresponde à remoção da mancha após limpeza com água corrente; a classe 4 traduz a remoção da mancha com um agente de limpeza fraco e a classe 2 agrupa produtos cuja remoção da mancha exige um solvente químico.

Tabela 5 – Resistência às manchas medida de acordo com a norma ISO 10545-14 [37], dos ladrilhos sem e com vidrado K.

Agente manchante	Ladrilho sem vidrado K	Ladrilho com vidrado K
Crómio verde	Classe 2	Classe 5
Azeite	Classe 2	Classe 5
Solução de iodo	Classe 5	Classe 5

Uma outra característica associada a este produto é a sua elevada resistência química. Na tabela 6 apresentam-se os resultados obtidos nos ensaios efectuados de acordo com a norma ISO 10545 [38]. U indica que o ensaio foi executado como se se tratasse de um material não vidrado, uma vez que a quantidade de vidrado utilizado não altera a superfície do ladrilho, permitindo a sua classificação como um produto natural (sem vidrado). O L e o H significam que a concentração do agente químico utilizado é, respectivamente, baixa e elevada. A traduz que após contacto com as soluções químicas, o produto não apresenta qualquer defeito superficial, isto é, não sofre ataque químico. Como se pode observar na tabela 6 o material vidrado não sofre qualquer ataque quando em contacto com os diversos agentes químicos testados.

Tabela 6 - Resistência química medida de acordo com a norma ISO 10545-13 [38], dos ladrilhos com aplicação do vidrado K.

Agente químico	Ladrilho com vidrado K
Químicos domésticos comuns	
Cloreto de amónio, 100 g/l	UA
Químicos para uso em piscinas	
Solução de hipocloreto de sódio, 20 mg/l	UA
Ácidos e bases a baixas concentrações	
Solução de ácido clorídrico, 3% (v/v)	ULA
Hidróxido de potássio, 30 g/l	ULA
Ácido cítrico, 100 g/l	ULA
Ácidos e bases a elevadas concentrações	
Solução de ácido clorídrico, 18% (v/v)	UHA
Hidróxido de potássio, 100 g/l	UHA
Ácido láctico, 5% (v/v)	UHA

A tabela 7 apresenta as características deste produto com aplicação do tratamento da microporosidade superficial (aplicação vidrado K). Da análise da tabela, destacam-se os baixos índices de absorção de água, muito inferiores aos exigidos pela norma, e as elevadas resistências mecânicas e à abrasão profunda.

Tabela 7 – Características técnicas do produto com vidrado K.

Parâmetros analisados	Valores do produto	Valores exigidos pela norma EN 14411:2006, anexo M, grupo AIa
Absorção de água (%)	< 0,05	< 0,5
Resistência mecânica (N/mm ²)	> 35	≥ 28
Modulo de ruptura (N)	≥ 1300 para espessuras superiores a 7,5 mm	≥ 1300 para espessuras superiores a 7,5 mm
Abrasão profunda (mm ³)	< 185	< 275

3.3. Comportamento antimicrobiano das peças em porcelanato extrudido

3.3.1 Influência do vidrado K

Como foi referido anteriormente, o desafio deste trabalho é desenvolver um produto com características antimicrobianas a partir da gama de pastas extrudidas da *Aleluia Cerâmicas, S.A.*

A primeira etapa foi avaliar a acção antimicrobiana, através do ensaio da redução, da pasta natural sem e com a aplicação do vidrado K.

A pasta natural é uma pasta não corada, ou seja, sem a adição de pigmentos cerâmicos, composta por argilas e feldspato. Pela análise da figura 24, verifica-se que a presença do vidrado K promove um aumento da taxa de redução da bactéria *E. coli* de 5,1%. No entanto, a taxa de redução desta bactéria pelo produto obtido com pasta natural e vidrado K é reduzida (10.8%).

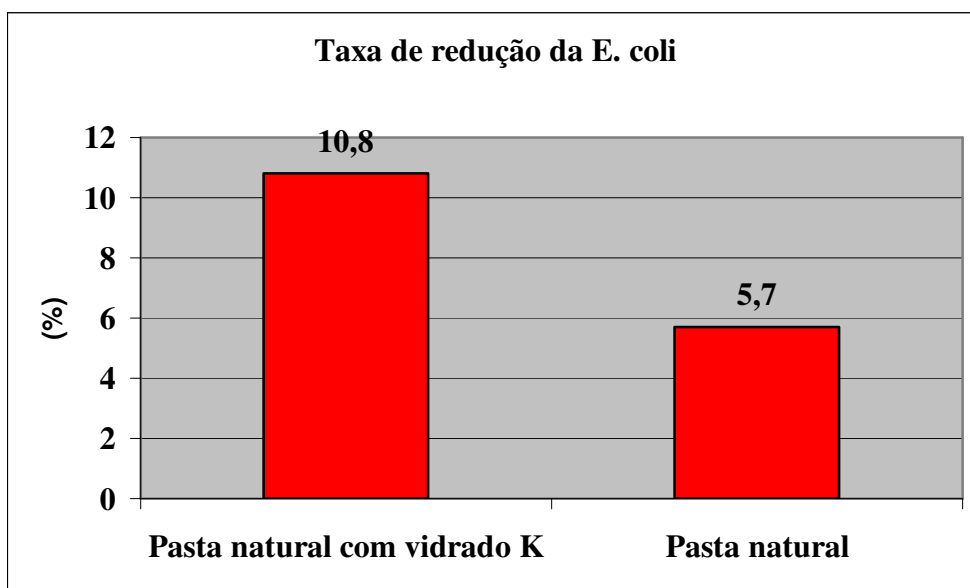


Figura 24 - Resultados do teste de redução da *E. coli* às amostras de pasta natural com e sem o vidrado K.

3.3.2. Influência do tratamento químico e térmico

A introdução de iões de prata na superfície do material foi efectuada de acordo com o procedimento desenvolvido por Angiolleto [32] e que deu bons resultados. Estes autores optimizaram uma solução aquosa com iões de prata a partir da mistura de nitrato de prata, que actuou como fonte de prata, e de nitrato de sódio, que serviu como veículo de transporte. A escolha dos nitratos deveu-se essencialmente à sua baixa temperatura de fusão o que faz com que estejam no estado líquido à temperatura a que o tratamento térmico é efectuado. A solução foi homogeneizada e aplicada sobre o suporte cerâmico cozido. Após aplicação, o material foi sujeito a um tratamento térmico a 430°C durante 2 horas. A selecção das condições de tratamento (tempo e temperatura) foi efectuada com base nos resultados reportados por Angiolleto [32] tendo em conta que quanto mais longo for o tratamento térmico mais iões de prata migram da superfície para o interior da peça, diminuindo o efeito antimicrobiano pretendido.

Como se pode observar na figura 25, a aplicação da solução contendo prata e a execução do tratamento térmico melhora a acção antimicrobiana do porcelanato em 27,8%.

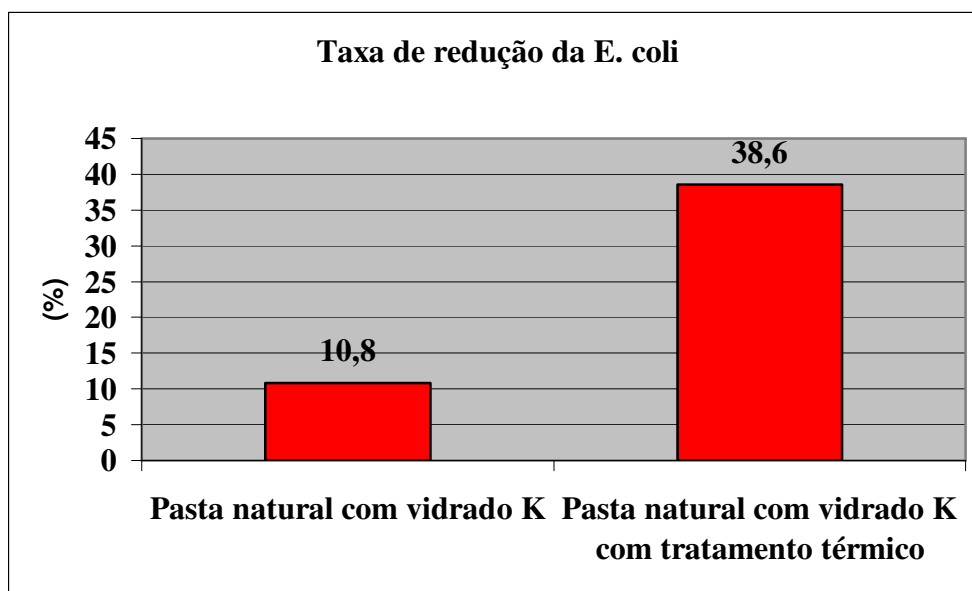
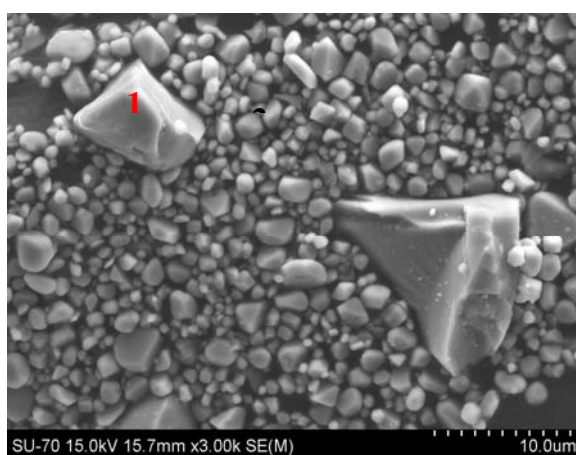


Figura 25 - Resultados do teste de redução da *E. coli* às amostras de pasta natural com vidrado K com e sem o tratamento químico e térmico.

3.3.3. Influência da adição do pigmento de Ferro e Crómio

As peças em porcelanato extrudido de pasta cinza claro, cinza escuro e preta, actualmente comercializadas pela fábrica, contêm 0,3, 0,5 e 2,5%, respectivamente, de pigmento preto. Este pigmento é constituído por partículas de dimensões reduzidas ($< 4 \mu\text{m}$) verificando-se também a presença de algumas partículas de dimensões bastante superiores ($>10 \mu\text{m}$) (Fig.26). Os elementos químicos predominantes são o crómio e o ferro (tabela da Fig. 26), sendo os grãos mais pequenos mais ricos em ferro e os maiores em crómio. Segundo Martin [39], estes elementos também possuem actividade antimicrobiana. De acordo com este autor a fungotxicidade dos elementos apresenta a seguinte ordem: $\text{Ag}>\text{Hg}>\text{Cu}>\text{Cd}>\text{Cr}>\text{Ni}>\text{Pb}>\text{Co}>\text{Zn}>\text{Fe}>\text{Ca}$. Também Kalantari e Ghaffari [22], mostraram que os iões de ferro e o crómio têm efeitos inibitórios no crescimento bacteriano.



Elementos	% atómica	
	Ponto 1	Ponto 2
Crómio	41,09	32,51
Ferro	27,17	61,21
Alumínio	16,83	0,85
Magnésio	11,32	0,68
Titânio	0,88	0,62
Oxigénio	2,7	4,13

Figura 26 – Microestrutura (MEV) do pigmento preto e análise química por EDX dos grãos assinalados na micrografia.

Aproveitando o facto da pasta cinza escura (0,5% de pigmento preto) estar em produção, determinou-se o seu poder antimicrobiano. Como se pode observar na figura 27, a adição de 0,5% de pigmento preto à pasta promoveu um aumento de 28,4% da taxa de redução da bactéria *E. coli*.

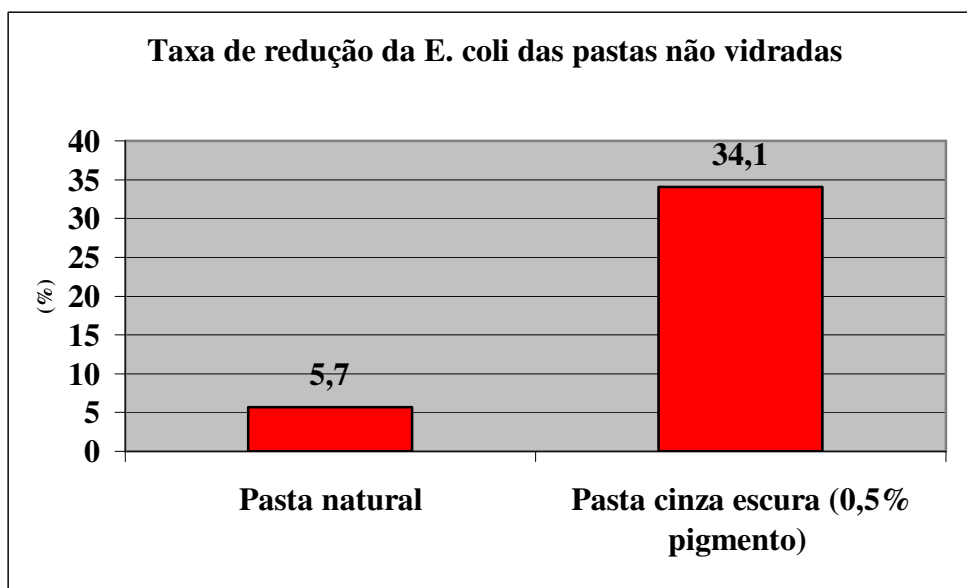


Figura 27 – Resultados do teste de redução da *E. coli* às amostras de pasta natural e pasta cinza escura não vidradas.

Perante os resultados obtidos, resolveu-se estudar a influência da percentagem de pigmento preto na actividade antimicrobiana do produto.

A análise da figura 28 permite concluir que:

- A actividade antimicrobiana para a *E. coli* aumenta com o incremento da quantidade de pigmento na pasta até adições de 2,5% em peso;
- O tratamento químico e térmico é um factor decisivo para se obterem melhores resultados, tendo a taxa de redução apresentado um aumento, para todas as percentagens de pigmentos testadas;

A utilização do vidrado K promove o aumento da actividade antimicrobiana, tal como pode ser analisado na tabela 8.

Tabela 8 – Resultados da taxa de redução da bactéria *E. coli*.

Pasta	Sem vidrado K	Com vidrado K
Natural	5,7 %	10,1%
Cinza escura (0,5% pigmento)	34,1%	40,2%

- Os melhores resultados conseguem-se para o produto obtido a partir da pasta preta, com vidrado K e com tratamento químico e térmico, isto é, uma taxa de redução da bactéria *E. coli* de 81,1%;

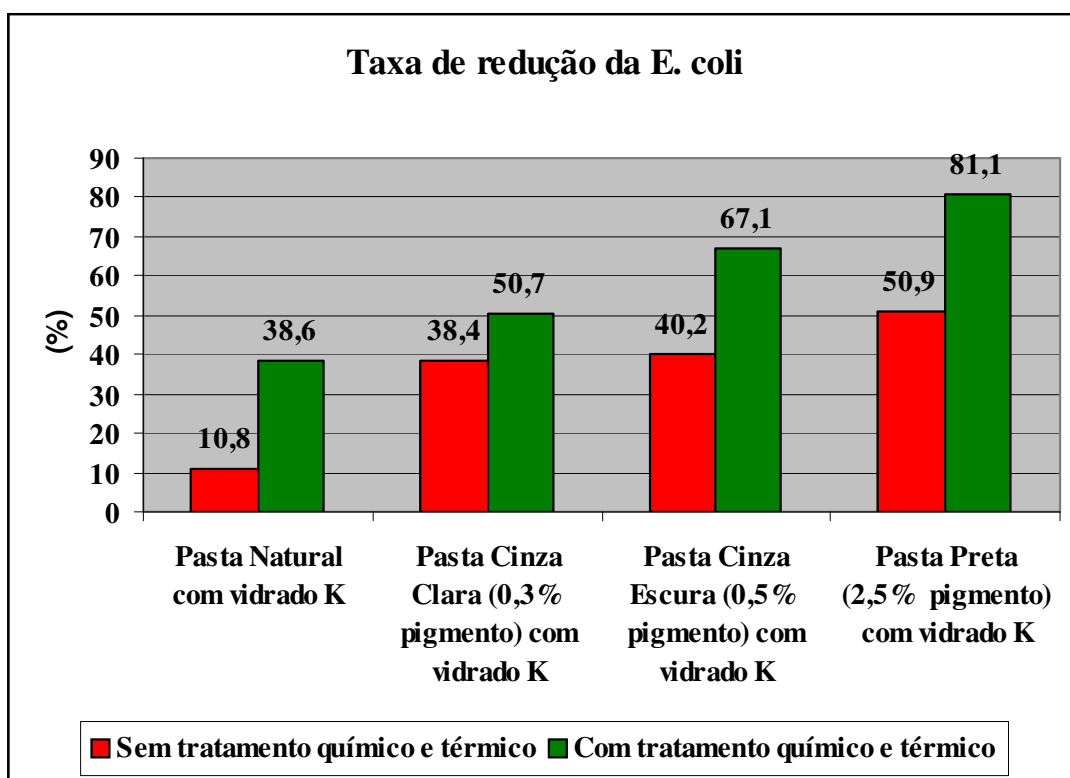


Figura 28 - Resultados do teste de redução da *E. coli* às amostras de pasta cinza claro, cinza escuro e preto com e sem tratamento químico e térmico.

3.3.4. Redução da actividade da bactéria *S. aureus* das duas melhores composições

A taxa de redução da bactéria *S. aureus* foi determinada para os dois produtos que apresentaram os melhores resultados para a bactéria *E. coli*, isto é, os obtidos a partir da pasta cinza escuro e da pasta preta, ambas com a aplicação do vidrado K e sujeitas ao tratamento químico e térmico.

Como se pode observar na figura 29 estas amostras também apresentam elevadas taxas de redução da bactéria *S. aureus* (63,2 e 77,8%) sendo, no entanto, ligeiramente inferiores às obtidas para a bactéria *E. coli*, (-3,3% para a pasta cinza escura e -3,9% para a pasta preta). Este comportamento é justificado pela diferença de espessura da camada peptidoglicana das bactérias, ou seja, quanto menor a camada peptidoglicana, que é o que acontece na *S. aureus*, maior é a resistência aos agentes antimicrobianos, devido à produção de enzimas cuja função é conferir maior resistência aos agentes nocivos desta célula.

Todos os resultados obtidos para os ensaios antimicrobianos encontram-se no anexo III.

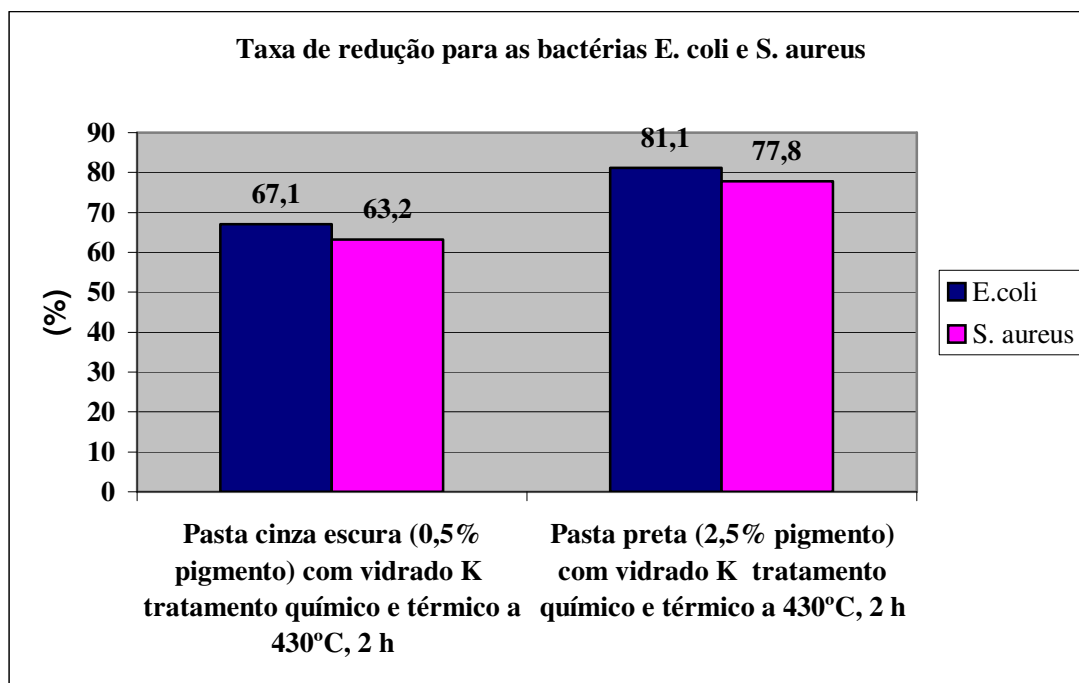


Figura 29 - Resultados comparativos do teste de redução da *E. coli* e da *S. aureus* às amostras de pasta cinza escuro e preto com vidrado K e com tratamento químico e térmico.

3.3.5. Difusão em ágar das bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

O teste de difusão em ágar foi efectuado para as amostras com aplicação do vidro K e com tratamento químico e térmico (pasta natural e pastas coradas) encontrando-se os resultados patentes na figura 30. Nas peças de pasta preta (2,5% de pigmento - 1030 KT) e pasta cinza escura (0,5% de pigmento - 1025KT) observa-se, para ambas as bactérias, a inibição do crescimento por baixo das mesmas. Nas outras amostras (pasta natural – KT e pasta cinza claro - 1020 KT) verifica-se algum crescimento bacteriano. Em nenhuma das amostras testadas se observaram zonas de inibição do crescimento bacteriano, ou seja, não é visível a existência de halos à sua volta.

Assim conclui-se que a actividade antimicrobiana das amostras de porcelanato só é eficaz quando em contacto directo com as bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

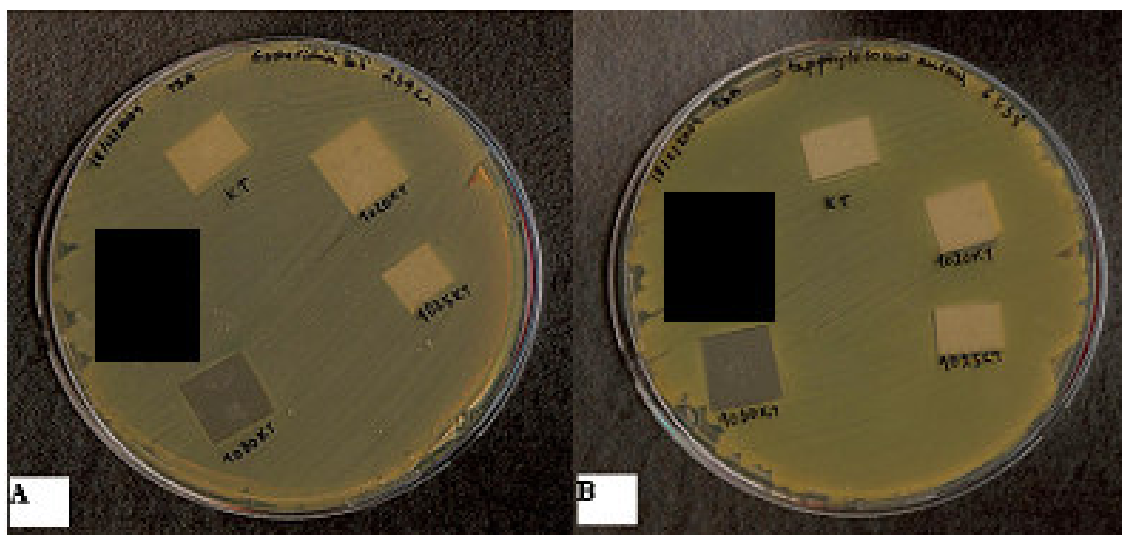


Figura 30 – Teste da difusão em ágar para as bactérias *E. coli* (A) e para a *S. aureus* (B), para as diversas pastas com o vidro K e após o tratamento químico e térmico (KT - pasta natural, 1020KT - pasta cinza claro, 1025KT - pasta cinza escura e 1030 KT - pasta preta).

3.3.6. Características do porcelanato extrudido com propriedades antimicrobianas

A caracterização das peças de porcelanato extrudido que apresentaram o melhor comportamento antimicrobiano permitiu concluir que estas possuem uma elevada resistência às manchas (Tabela 9). Estes ladrilhos foram classificados como pertencendo à classe 5 para todos os agentes manchantes testados. Isto significa que, 24 horas após o manchamento, a mancha consegue ser removida apenas com água corrente sem deixar qualquer vestígio. Este comportamento está relacionado com a utilização do vidrado K, o qual preenche a microporosidade existente na superfície das peças e diminui a sua rugosidade superficial, tal como já foi referido anteriormente. A aplicação da solução de nitrato de prata e de nitrato de sódio e o tratamento térmico não alteraram a resistência do material às manchas. Constatou-se ainda que os ladrilhos que exibem melhor comportamento antimicrobiano (pasta cinza escuro e pasta preta) apresentam valores de rugosidade muito semelhantes aos apresentados pelo ladrilho de pasta natural (não corada) com vidrado K sem tratamento químico e térmico (Tabela 10). Ou seja, a execução do tratamento químico e térmico também não alterou as características da superfície dos ladrilhos em termos de rugosidade.

Tabela 9 – Resultados dos ensaios de resistência às manchas de acordo com a norma ISO 10545-14 [37], dos ladrilhos com aplicação dos vidrados K e dos ladrilhos antimicrobianos (pastas cinza escuro e preta ambas com vidrado K e tratamento químico e térmico).

Agente manchante	Ladrilho com Vidrado K	Ladrilho antimicrobiano cinza escuro	Ladrilho antimicrobiano preto
Crómio verde	Classe 5	Classe 5	Classe 5
Azeite	Classe 5	Classe 5	Classe 5
Solução de iodo	Classe 5	Classe 5	Classe 5

Tabela 10 – Resultados dos ensaios de rugosidade aos ladrilhos antimicrobianos e ao ladrilho só com aplicação do vidrado K.

	Ladrilho com vidrado K	Ladrilho antimicrobiano cinza escuro	Ladrilho antimicrobiano preto
Ra (µm)	2,854	2,824	2,838
Rz (µm)	20,3	20,5	20,3
Rmáx (µm)	24,5	25,7	24,1

Em relação ao comportamento aos agentes químicos (Tabela 11), verifica-se que todos os ladrilhos têm o mesmo comportamento anti-ácido (UA, ULA e UHA), excepto o ladrilho antimicrobiano preto que após contacto com uma solução de ácido clorídrico, 18% (v/v), sofre um ligeiro ataque químico na sua superfície (UHB).

Tabela 11 - Resultados dos ensaios de resistência química de acordo com a norma ISO 10545-13 [38], dos ladrilhos com aplicação do vitrado K e dos ladrilhos antimicrobianos (pastas cinza escuro e preta, ambas com vitrado K e tratamento químico e térmico).

Agente químico	Ladrilho com vitrado K	Ladrilho antimicrobiano cinza escuro	Ladrilho antimicrobiano preto
Químicos domésticos comuns			
Cloreto de amónio, 100 g/l	UA	UA	UA
Químicos para uso em piscinas			
Solução de hipocloreto de sódio, 20 mg/l	UA	UA	UA
Ácidos e bases a baixas concentrações			
Solução de ácido clorídrico, 3% (v/v)	ULA	ULA	ULA
Hidróxido de potássio, 30 g/l	ULA	ULA	ULA
Ácido cítrico, 100 g/l	ULA	ULA	ULA
Ácidos e bases a elevadas concentrações			
Solução de ácido clorídrico, 18% (v/v)	UHA	UHA	UHB
Hidróxido de potássio, 100 g/l	UHA	UHA	UHA
Ácido láctico, 5%(v/v)	UHA	UHA	UHA

Na figura 31 apresenta-se a microestrutura da superfície do ladrilho antimicrobiano preto e a sua análise química. A superfície do material não revela a presença de poros observando-se a presença de alguns cristais. A análise química efectuada (tabela da Fig. 31) permitiu confirmar a presença de prata, devido ao tratamento químico e de crómio e ferro resultantes da presença do pigmento preto. Os outros elementos detectados são próprios do vidrado K.

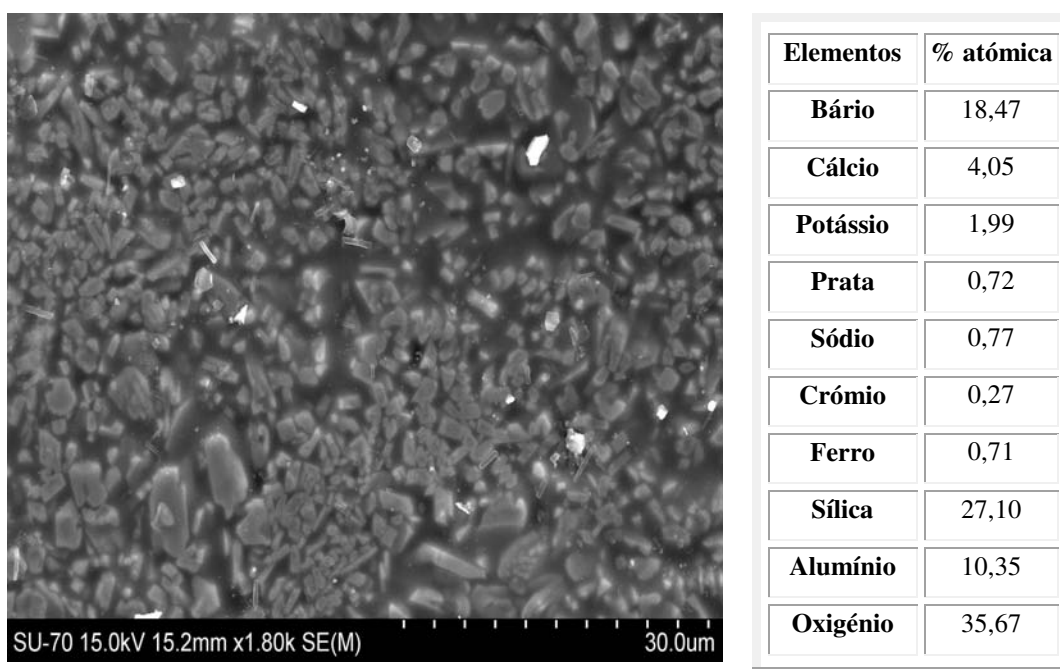


Figura 31 – Microestrutura (MEV) do ladrilho preto antimicrobiano e análise química por EDX numa área da micrografia.

4. Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

O trabalho realizado para o desenvolvimento de um produto em porcelanato extrudido com acção antimicrobiana, antimancha e resistente quimicamente levou às seguintes conclusões:

- ✓ É possível desenvolver um produto antimicrobiano com uma eficácia acima dos 77% para a bactéria *S. aureus* e dos 81% para a bactéria *E. coli*, a partir de uma pasta de porcelanato extrudido com 2,5% de pigmento cerâmico preto contendo crómio e ferro na sua composição, seguido de uma aplicação à pistola de uma pequena quantidade de vidrado K e de um tratamento químico (solução com 98% de NaNO_3 e 2% de AgNO_3) e térmico (2 horas a 430°C).
- ✓ O produto desenvolvido apresenta características antimancha, pertencendo à classe 5. Este comportamento deve-se à aplicação de pequenas quantidades de vidrado K, o qual promove o alisamento de toda a superfície durante o processo de cozedura, preenchendo os microporos e eliminando assim os pontos preferenciais para a acumulação de sujidades e permitindo uma fácil limpeza do material.
- ✓ O produto obtido é resistente quimicamente, sendo classificado como UA, ULA e UHA para todos os agentes químicos testados, excepto para a solução de ácido clorídrico, 18% (v/v), a qual promove um ligeiro ataque químico na superfície (UHB).
- ✓ O produto desenvolvido é comercialmente interessante pois alia um elevado efeito antimicrobiano com um incremento do custo de produção relativamente reduzido.

✓ O efeito antimicrobiano conseguido neste trabalho só funciona quando as bactérias estão em contacto directo com o produto desenvolvido.

✓ A eficácia do tratamento químico e térmico é visível para todas as composições estudadas. No entanto, é particularmente relevante no caso dos produtos de pasta natural com vidrado K para os quais se obteve um aumento da taxa de redução da bactéria *E. coli* de 27,8% resultante da presença dos iões de prata na superfície do material confirmando o seu efeito oligodinâmico.

Durante a realização deste trabalho surgiram algumas ideias para o aprofundamento do estudo de materiais de porcelanato extrudido com acção antimicrobiana nomeadamente:

✓ Optimização da quantidade de pigmento preto.

✓ O estudo da relação entre a quantidade de prata na solução/quantidade aplicada e a actividade antimicrobiana do material.

✓ A optimização das condições do tratamento térmico (temperatura e tempo).

✓ O estudo do efeito de outros pigmentos inorgânicos, utilizados normalmente para a coloração de pastas de porcelanato, e que contenham outros iões metálicos nomeadamente cobre, cobalto, zinco, níquel ou chumbo de modo a obter materiais com efeito antimicrobiano mas com outras cores.

Anexo I - Procedimento para o teste da difusão em ágar

a) Esterilização das amostras

As amostras a ensaiar foram embrulhadas em papel Kraft e fechadas convenientemente para posterior esterilização.

A esterilização foi feita por calor húmido e efectuada numa autoclave durante 21 minutos a uma temperatura de 120°C (pressão relativa de 1 atm).

b) Preparação do meio de cultura

Preparou-se 200 ml de meio de cultura agarizado, Tryptic Soy Agar (TSA) para crescimento em placa de *petri*. Para o efeito adicionou-se num frasco com tampa: 6 g de Tryptic Soy Broth (*Merk*), 2,4g de ágar-ágar (*Merk*) e 200 ml de água destilada.

Em seguida esta solução foi levada a autoclave para esterilização (120°C, 21min).

c) Preparação das placas com o meio de cultura

O frasco contendo TSA foi colocado no microondas na posição de descongelamento até ficar completamente líquido.

Assim que a temperatura da solução atingiu 55°C, o TSA fundido foi distribuído pelas quatro caixas de *petri* (140x21 mm), duas para cada estirpe bacteriana e esperou-se que solidificasse (Fig. A1). Este procedimento foi feito perto de uma chama e na câmara de fluxo laminar para evitar contaminações.



Figura A1 – Colocação do meio de cultura nas caixas de *petri*.

d) Preparação do inóculo bacteriano e preparação do ensaio antimicrobiano

Iniciou-se o procedimento com a desinfecção da área de trabalho, na câmara de fluxo laminar, com álcool etílico a 96% (v/v).

Foram utilizadas duas culturas frescas bacterianas de *Staphylococcus aureus* NCTC 6874 e *Escherichia coli* ATCC 25922 em meio sólido (TSA).

Com o auxílio de uma lamparina, esterilizou-se uma ansa à chama e retiraram-se duas colónias individualizadas de cada cultura, que foram de seguida transferidas para tubos estéreis de 1,5ml contendo uma solução de NaCl a 0,9% (m/v). As células foram suspendidas na solução salina por agitação leve e a turvação padronizada segundo a escala de McFarland. Esta escala mede o grau de turvação da suspensão bacteriana por comparação com uma solução de cloreto de bário. Os valores da escala variam entre 0 e 5 unidades. Para este ensaio usaram-se inoculos com 0,5 unidades McFarland.

Para a sementeira à superfície dos inoculos de *S. aureus* e *E. coli*, mergulhou-se um cotonete estéril no tubo contendo um inóculo e espalhou-se cuidadosamente sobre toda a superfície da caixa de *petri* contendo o TSA.

As amostras cerâmicas a testar foram distribuídas à superfície de cada placa de *petri* com algum espaçamento entre elas (Fig. A2).

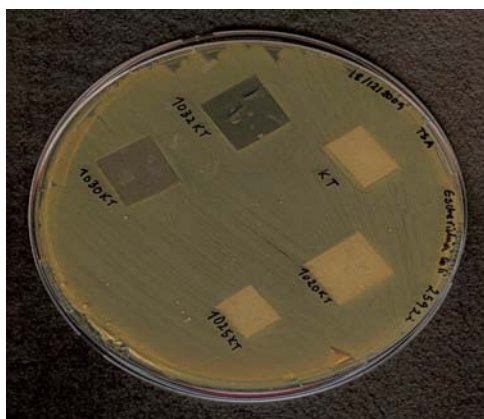


Figura A2 – Amostras prontas para incubação durante 24 horas a 37°C.

Em seguida, as caixas de *petri* foram colocadas na estufa a 37°C durante 24 horas para incubação, e depois foram observados e registados os resultados.

Anexo II - Procedimento para o teste da redução

Tal como no procedimento do teste da difusão em agar, este teste iniciou-se com a esterilização das amostras, seguida da preparação do meio de cultura e da preparação das placas com o meio de cultura.

a) Preparação do crescimento bacteriano

Foram utilizadas duas estirpes bacterianas - *Staphylococcus aureus* NCTC 6871 e a *Escherichia coli* ATCC 25922.

Iniciou-se o procedimento, esterilizando a bancada de trabalho da câmara de fluxo laminar com álcool a 96% (v/v).

Para o crescimento de cada uma das estirpes indicadoras em meio líquido, pipetaram-se 10 ml de uma solução de meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB) para um tubo de ensaio (Fig. A3).



Figura A3 – Transferência do TSB para os tubos de ensaio.

Porcelanato extrudido com acção antimicrobiana, antimancha e resistente quimicamente

Com o auxílio de uma lamparina, esterilizou-se uma ansa por aproximação à chama. Esperou-se que arrefecesse um pouco e recolheram-se as células no meio sólido (das 2 colecções de cultura) para o interior do tubo de ensaio com TSB. Fechou-se e identificaram-se os 2 tubos de ensaio (Fig. A4).

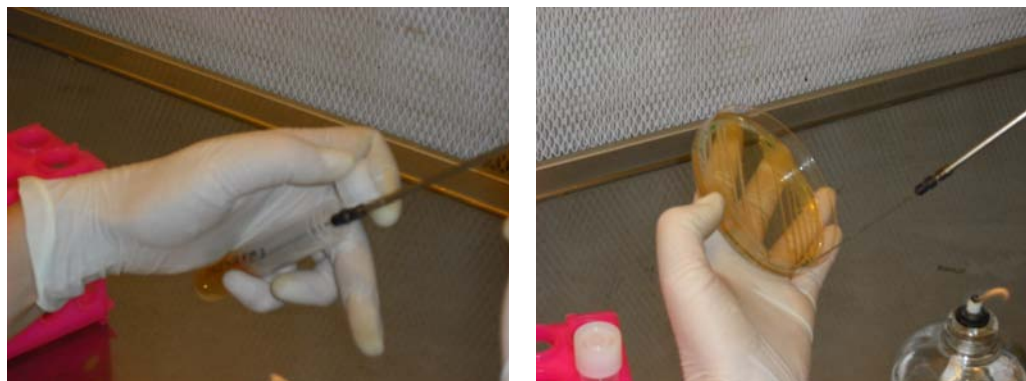


Figura A4 – Transferência de células para o tubo de ensaio.

Para promover o crescimento das células, os tubos de ensaio foram colocados num agitador durante 24 horas a uma temperatura constante de 37°C e sob agitação de 150 r.p.m. (Fig. A5).



Figura A5 – Promoção do crescimento das células no agitador.

c) Preparação da suspensão de células e respectivas diluições

Num erlenmeyer, adicionou-se 0.7 ml do inoculo a uma solução (70 ml) estéril tamponada de hidrogenofosfato de potássio (pH 7.2). Este constituiu o meio de cultura *teste*. Para estimar o número inicial de células viáveis, retirou-se uma alíquota para efectuar diluições em série decimais (Fig. A6) que foram em seguida plaqueadas (100 μ l em cada placa) em placas de *petri* contendo TSA. Estas placas foram de seguida incubadas a 37°C durante 24h, altura em que foram analisadas e contadas as unidades formadoras de colónias (UFC). As determinações de UFC foram feitas em triplicado, usando pelo menos duas diluições.



Figura A6 – Pormenor dos vários tubos de ensaio com as diluições.

Para realizar o teste de avaliação da redução bacteriana, adicionaram-se as amostras a testar ao meio de cultura *teste* (Fig. A7) e incubaram-se durante 1 h, com agitação, a 20°C (Fig. A8). Terminada a incubação, efectuaram-se as contagens de células viáveis através da determinação de UFC/ml, como descrito para a contagem de células iniciais (Fig. A9).



Figura A7 – Colocação da amostra a testar no erlenmeyer.



Figura A8 – Colocação dos erlenmeyers no agitador.



Figura A9 – Aspecto das placas de *petri* nas quais serão contadas as UFC.

Anexo III – Resultados dos ensaios antimicrobianos

Tabela A-1 - Valores médios dos testes antimicrobianos realizados com os ladrilhos.

Amostra	Bactéria	N.º inicial de colónias de bactérias (UFC)	N.º final de colónias de bactérias (UFC)	Redução (%)	Sobrevivência (%)
Pasta natural	<i>E. coli</i>	4,40E+06	4,15E+06	5,7	94,3
Pasta cinza escura (0,5% corante)	<i>E. coli</i>	4,40E+06	2,90E+06	34,1	65,9
Pasta natural com vidrado K	<i>E. coli</i>	6,50E+06	5,80E+06	10,8	89,2
Pasta natural com vidrado K+ Tratamento químico e térmico (430°C, 2h)	<i>E. coli</i>	4,40E+06	2,70E+06	38,6	61,4
Pasta cinza claro (0,3% corante) com vidrado K	<i>E. coli</i>	3,65E+06	2,25E+06	38,4	61,6
Pasta cinza claro (0,3% corante) com vidrado K+ Tratamento químico e térmico (430°C, 2h)	<i>E. coli</i>	3,65E+06	1,80E+06	50,7	49,3
Pasta cinza escura (0,5% corante) com vidrado K	<i>E. coli</i>	1,10E+07	6,55E+06	40,2	59,8
Pasta cinza escura (0,5% corante) com vidrado K+ Tratamento químico e térmico (430°C, 2h)	<i>E. coli</i>	1,10E+07	3,60E+06	67,1	32,9
Pasta cinza escura (0,5% corante) com vidrado K+ Tratamento químico e térmico (430°C, 2h)	<i>S. aureus</i>	3,56E+07	1,31E+07	63,2	36,8
Pasta preta (2,5% corante) com vidrado K	<i>E. coli</i>	5,30E+06	2,60E+06	50,9	49,1
Pasta preta (2,5% corante) com vidrado K + Tratamento químico e térmico (430°C, 2h)	<i>E. coli</i>	5,30E+06	1,00E+06	81,1	18,9
Pasta preta (2,5% corante) com vidrado K + Tratamento químico e térmico (430°C, 2h)	<i>S. aureus</i>	3,56E+07	3,92E+06	77,8	22,2

Bibliografia

- [1] Architectura e Construção, Impresa Publishing, 52, 98, Dez.2008-Jan.2009.
- [2] <http://nanoprotect.co.uk/>
- [3] R. J. Luckens, Structure activity relationship, In Kleinzellar, A., Springer, G. F., Wittmann H. G. (ed.), Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, Chemistry of Fungicidal Action, Springer – Verlag, New York, 10, 76-90, 1971.
- [4] A. Goetz, Water sanitation with silver. J. American Water Works Association, 35, 579-584, 1943.
- [5] M.J. Pelczar, Microbiologia: Conceitos e Aplicações, São Paulo: MAKRON Books do Brasil, 2, 517, 1996.
- [6] A. Tucci, A. Nanetti, L. Malmusi, G. Timellini, Superfícies cerâmicas com acção microbiológica para ambientes hospitalares, Cerâmica Industrial, 12, 7-10, 2007.
- [7] R. T. Belly, G. C. Kydd, Silver resistance in microorganisms, Dev. Ind. Microbiol., 23, 567-577, 1982.
- [8] P. D. Bagg, D. J. Rainnie, The effect of silver ions on the respiratory chain of Escherichia Coli, Can. J. Microbiol., 20, 883-889, 1974.
- [9] J. R. Furr, A. D. Russell, D. Turner, A. Andrews, Antibacterial activity of actisorb plus, actissorb and silver nitrate, J. Hosp. Infect., 27, 201-208, 1994.
- [10] R. B. Thurman, C. P. Gerba, The molecular mechanisms of copper and silver ions disinfection of bacteria and viruses, CRC Crit. Rev. Environ. Control, 18, 295-315, 1989.
- [11] S. Y. Liao, D. C. Read, W. J. Pugh, J. R. Furr, A. D. Russell, Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions, Lett. Appl. Microbiol., 25, 279-283, 1997.
- [12] W.J. Schreurs, H. Rosenberg, Effect on silver ions on transport and retention of phosphate by Escherichia Coli, J. Bacteriol., 152, 7-13, 1982.
- [13] http://pt.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli
- [14] W. K. Jung, H. C. Koo, K. W. Kim, S. Shin, S. H. Kim, Y. H. Park; Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli, Appl. Environ. Microbiol., 74, (7), 2171-2178, Abril 2008.
- [15] http://pt.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus

-
- [16] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, J. O. Kim, A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 52, 662-668, 2000.
- [17] S. Pal, Y. K. Tak, J. M. Song, Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 1712-1720, 2007.
- [18] G. McDonnell, A. D. Russell, Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance, *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 147-179, 1999.
- [19] I. Sondi, B. Salopek-Sondi, Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria, *J. Colloid Interface Sci.*, 275, 177-182, 2004.
- [20] D. Mohan, J. Pittman, Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water- a review, *J. Hazard. Mater.*, 137, 762-811, 2006.
- [21] V. Juturu, J. R. Komorowski, Chromium supplements, glucose and insulin responses, *Am. J. Clin. Nutr.*, 78 (1), 192-193, 2003.
- [22] N. Kalantari, S. Ghaffari, Evaluation of toxicity of heavy metals for *Escherichia Coli* growth, *Iran. J. Environ. Health, Sci. Eng.*, 5, (3), 173-178, 2008
- [23] A. Hoffbrand, J. Pettit, P. Moss, *Fundamentos em hematologia*. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- [24] S.C. Andrews, Iron storage in bacteria, *Adv. Microb. Physiol.*, 40, 281-351, 1998.
- [25] A. E. Benlloch, Vidrados cerâmicos de natureza vitrocrystalina: Parte 1, *Cerâmica Industrial*, 6 (2), 17-27, 2001.
- [26] D. Alvarez-Estrada, Formación y eliminación de burbujas en vidriados cerámicos, *Bol. Soc. Esp. Ceram.*, 1, (8), 511-525, 1962.
- [27] M. Ferranis, E. Verne, Viscous phase sintering of particule inforced glass matrix composites, *J. Eur. Ceram. Soc.*, 16, 421-427, 1996.
- [28] A. Boccacci, G. Ondracek, Viscous sintering of non-spherical-borosilicate-glass powder, *Glastech Ver.*, 65, (3), 73- 78, 1992.
- [29] T. J. Clark, J. S. Reed, Kinetic process involved in the sintering and crystallization of glass powders, *J. Am. Ceram. Soc.*, 69, (11), 837 – 846, 1986.
- [30] M. J. Orts Tari, Tese de doutoramento - Sinterización de piezas de pavimento gresificado, Castellón: Universita de Valencia, Departamento d'Enginyeria Quimica, 1991.

-
- [31] A. R. West, Solid State Chemistry and Its Application, Chichester, England: John Wiley & Sons, 734, 1998.
- [32] E. Angiolleto, Desenvolvimento de Processo para a Fabricação de Cerâmicas com Propriedades Antimicrobianas, Tese de Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, S.C., Nov. 2003.
- [33] A. A. Ahmed, E. W. Abdallah, Effect of íon Exchange and Heat Treatment Conditions on the Diffusion of Silver Into a Soda-Lime-Silica Glass, Phys. Chem. Glasses, 38 (1), 42-50, 1997.
- [34] European Standard EN 14411 – Ceramic tiles – Definitions, classification, characteristics and marking, CEN, 2006.
- [35] A. Correia, Proposta para a avaliação da actividade antimicrobiana de materiais cerâmicos, Molecular Microbiology Lab – Departamento de Biologia – Universidade de Aveiro, 2009.
- [36] M. Dondi, M. Raimondo, C. Zanelli, Resistência ao manchamento de revestimentos cerâmicos, Cerâmica Industrial, 13, (5), 39-45, 2008.
- [37] International Standard ISO 10545-14 – Ceramic tiles – Part 14: Determination of resistance to stains, ISO, 1995.
- [38] International Standard ISO 10545-13 – Ceramic tiles – Part 13: Determination of chemical resistance, ISO, 1995.
- [39] H. Martin, The distribution of fungicidal activity over the periodic system, In Torgeson, DC (ed), Fungicides, Chemistry and Physiology Academic Press Inc. New York, 11, 101-107, 1969.